

Université du Québec

INRS-Eau

**MÉCANISMES DE PRISE EN CHARGE ET TOXICITÉ DE L'ARGENT CHEZ
UNE ALGUE VERTE EN RELATION AVEC LA SPÉCIATION CHIMIQUE**

Par

Claude Fortin

Thèse présentée

pour l'obtention

du grade Philosophiæ doctor (Ph.D.)

en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur externe

Émilien Pelletier
Institut des Sciences de la Mer
Université du Québec à Rimouski

Examineur externe

Neil Price
Département des sciences biologiques
Université McGill

Examineur interne

Jean-Christian Auclair, INRS-Eau

Directeur de recherche

Peter G. C. Campbell, INRS-Eau

« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont
ce qu'elles sont. »

- Aristote

REMERCIEMENTS

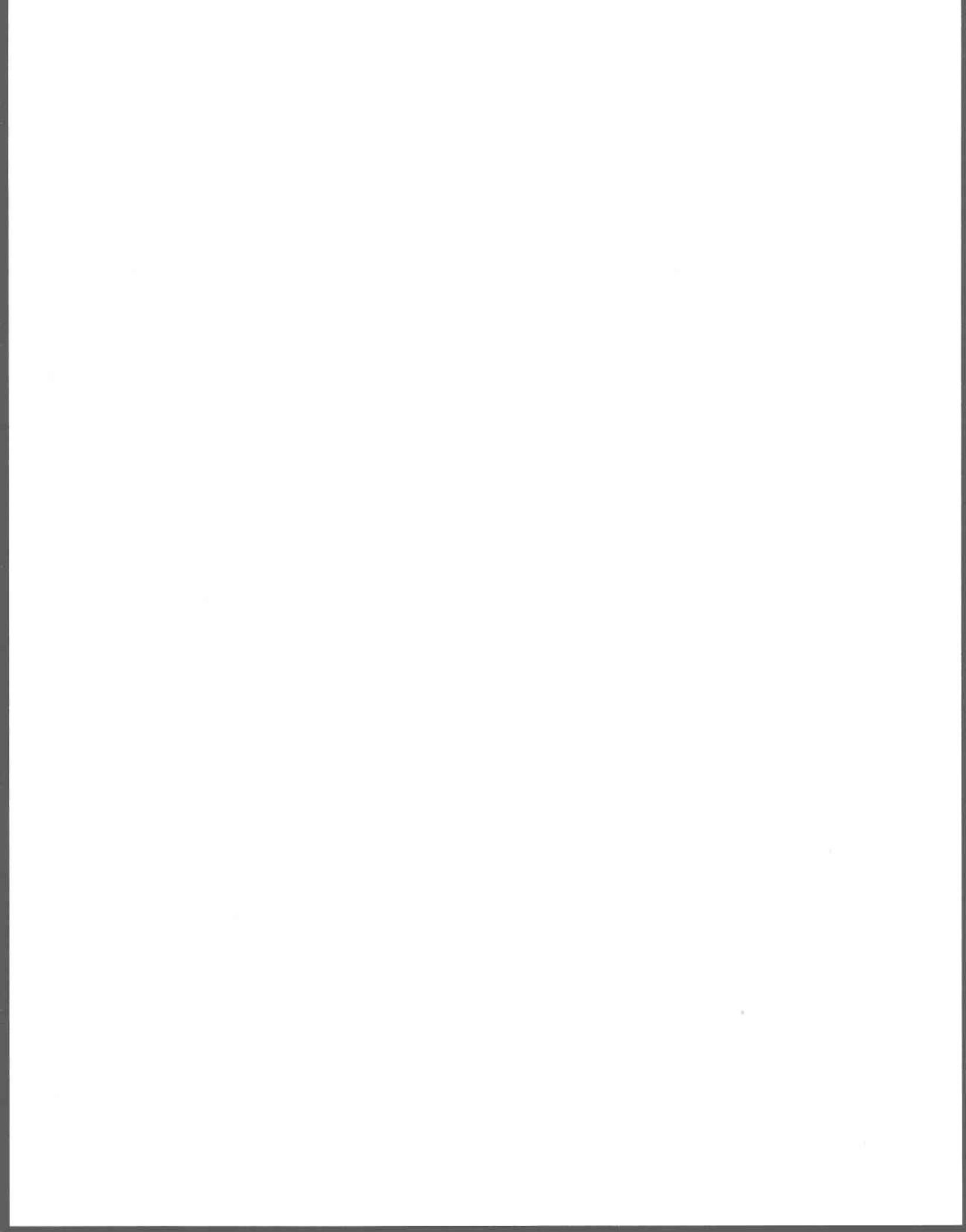
La réalisation de cet ouvrage a bénéficié de la collaboration d'une multitude de personnes que je désire remercier.

Tout d'abord, je dois souligner la qualité de l'encadrement qu'a su démontrer M. Peter Campbell en tant que directeur de recherche. Ses judicieux conseils et sa compétence ont été déterminants dans le cheminement de mes travaux. Je remercie également son collègue, M. Jean-Christian Auclair avec qui j'ai eu de nombreuses discussions et qui a su me donner des commentaires constructifs, tout spécialement lors de l'élaboration du turbidostat. De plus, des échanges fructueux avec les professeurs André Tessier, Jacques Buffle, Catherine Jumarie et Sheila Macfie ont eu des répercussions importantes sur le déroulement de cette recherche. Finalement, l'aide technique de Mélanie Guillot a été grandement apprécié.

J'ai pu, heureusement, compter sur une horde d'amis qui ont rendu la vie estudiantine des plus agréables, plus particulièrement Bernard Vigneault, Janick Lalonde, Catalina Alfaro de la Torre, pour ne nommer que ceux-là.

Je tiens à remercier mon épouse (et correctrice), Sophie Duchesne, pour son appui moral inconditionnel tout au long de mon cheminement doctoral. La réussite de ces travaux n'aurait pu se réaliser sans son soutien.

Enfin, cette recherche a été rendue possible grâce au support financier du Fonds des Chercheurs et de l'Aide à la Recherche (FCAR), du Réseau canadien des Centres de Toxicologie (RCCT), de Kodak Canada et du Conseil de Recherche en Sciences naturelles et Génie (CRSNG).



RÉSUMÉ

Une grande partie des observations de prise en charge, de bioaccumulation et de toxicité des métaux chez les organismes aquatiques peuvent être expliquées par le modèle de l'ion libre (MIL). Il existe toutefois des exceptions à ce modèle dont la plupart impliquent soit des complexes du métal avec des ligands assimilables (le métal est alors transporté accidentellement), soit des complexes lipophiles qui peuvent diffuser de façon passive à travers les membranes biologiques. Les objectifs de cette recherche consistaient à (i) déterminer si la prise en charge de l'argent à court terme (< 1 h) peut être accentuée par la présence de chlorure ou de thiosulfate (non-respect du MIL) et (ii) identifier le ou les mécanismes responsables de ce comportement. Pour ce faire, une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, a été choisie comme organisme cible et un radio-isotope de l'argent (^{110m}Ag) a été utilisé comme traceur. Les cellules étaient exposées dans des milieux inorganiques simples et l'accumulation de métal intracellulaire était mesurée en la distinguant de la fraction adsorbée à la surface. Après avoir caractérisé les taux de prise en charge de l'argent en absence de ligands, les concentrations d'argent et de chlorure ainsi que, par la suite, celles d'argent et de thiosulfate ont été augmentées conjointement de façon à conserver la concentration d'argent libre (Ag^+) constante. Dans de tels cas, le MIL prédit une prise en charge constante du métal, c'est-à-dire que la réponse biologique serait insensible à l'augmentation des concentrations des espèces AgCl_n^{n-1} ou $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_n^{n-2}$ en solution. Contrairement à cette prédiction, le taux de prise en charge observé était quatre fois plus élevé lorsque la concentration de chlorure passait de 0 à 4 mM pour une force ionique et une concentration de Ag^+ constantes (respectivement $6 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$ et 9 nM) alors qu'en présence de thiosulfate (0,11 μM), cet écart augmentait jusqu'à 20 fois la prise en charge observée en absence de ligands.

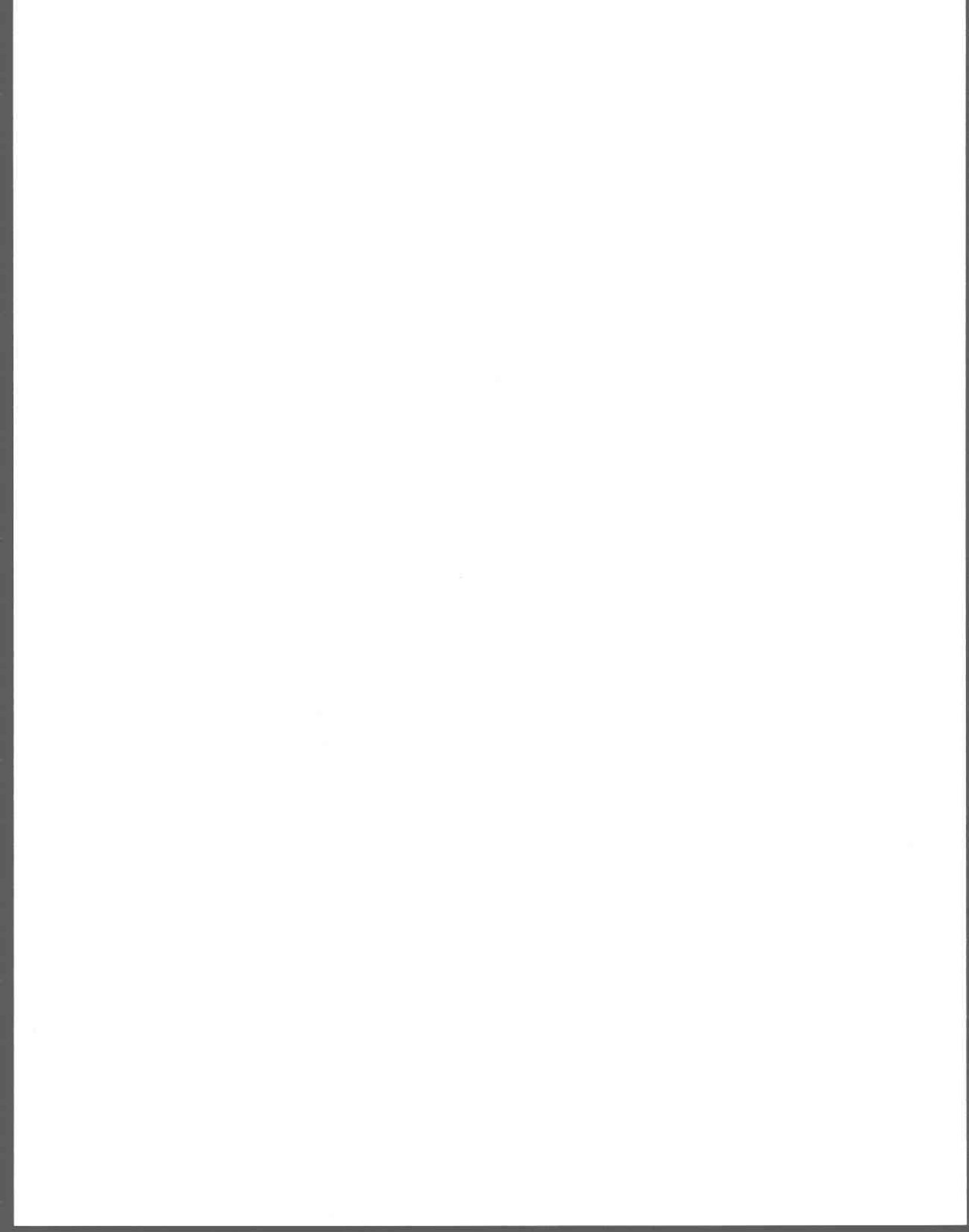
Deux mécanismes distincts peuvent expliquer les observations de stimulations de prise en charge de l'argent. Les taux de prise en charge de l'Ag observés chez *C. reinhardtii* sont plus élevés que ceux observés pour le Mn et le Cd, et ce d'environ trois ordres de grandeur. Les taux de transport transmembranaire sont si élevés que cette étape n'est plus limitante dans le processus de prise en charge, tel que prescrit par le MIL. Ainsi, la diffusion de l'Ag (sous toutes ses formes) à travers la couche non-mélangée qui sépare l'algue du milieu externe devient limitante. La vitesse de dissociation des complexes étant plus rapide que celle de diffusion des ions à travers cette zone non-mélangée ainsi que celle de prise en charge, l'accumulation devient proportionnelle aux concentrations des espèces d'Ag présentes à l'interface eau – algue. Ce n'est que lorsque le flux diffusif devient suffisamment élevé ($[\text{Ag}] > 10^{-7} \text{ M}$) que le transport transmembranaire redevient limitant dans la prise en charge de l'argent et que la complexation par le chlorure diminue l'accumulation de l'argent. De plus, dans nos conditions d'exposition, la diffusion passive du complexe neutre AgCl^0 n'a pu être évoquée pour expliquer l'augmentation de prise en charge en présence de chlorure. Dans le cas du thiosulfate, toutefois, un mécanisme de transport perméable au complexe AgS_2O_3^- a pu être identifié. Ce système de transport est sensible à la concentration environnante de SO_4^{2-} qui agit comme inhibiteur compétitif au transport de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ et de AgS_2O_3^- . Finalement, il a été démontré que le thiosulfate peut contribuer à augmenter la toxicité de l'Ag.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| REMERCIEMENTS | iii |
| RÉSUMÉ..... | v |
| TABLE DES MATIÈRES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xi |
| LISTE DES FIGURES..... | xiii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xix |
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 L'argent dans l'environnement..... | 1 |
| 1.1.1 Spéciation de l'Ag en milieu aquatique..... | 3 |
| 1.2 Toxicité et bioaccumulation de l'argent..... | 4 |
| 1.2.1 Algues..... | 5 |
| 1.2.2 Invertébrés | 8 |
| 1.2.3 Poissons | 9 |
| 1.3 Modèle de l'ion libre | 11 |
| 1.3.1 Hypothèses du MIL | 13 |
| 1.3.2 Concept de transport accidentel ou facilité..... | 15 |
| 1.4 Choix de l'organisme | 16 |
| 1.5 Objectifs | 17 |
| 2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE..... | 19 |
| 2.1 Algues..... | 19 |
| 2.2 Choix des milieux de culture et d'exposition..... | 19 |
| 2.2.1 Préparation des milieux de culture | 23 |
| 2.3 Équipements et produits | 24 |
| 2.4 Dosage des radio-éléments..... | 24 |
| 2.5 Méthodologie de récolte et d'exposition des cellules | 25 |
| 2.6 Récupération de l'Ag après filtration..... | 28 |
| 2.7 Distinction entre métal adsorbé et métal intracellulaire..... | 28 |
| 2.8 Efficacité de désorption de l' ^{110m} Ag lors du rinçage post-exposition | 30 |
| 2.9 Modélisation thermodynamique..... | 35 |
| 3. PRISE EN CHARGE DE L'ARGENT | 37 |
| 3.1 Introduction | 37 |
| 3.2 Méthodologie..... | 37 |
| 3.3 Résultats | 39 |
| 3.3.1 Prise en charge de l'argent libre | 39 |
| 3.3.2 Inhibition compétitive..... | 43 |
| 3.4 Discussion | 45 |
| 3.4.1 Voie d'entrée de l'Ag ⁺ | 47 |
| 3.5 Conclusion..... | 48 |
| 4. EFFET DU CHLORURE | 49 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.1 | Introduction..... | 49 |
| 4.2 | Méthodologie..... | 51 |
| 4.2.1 | Prise en charge de l'Ag..... | 51 |
| 4.2.2 | Expérience de type <i>pulse-chase</i> | 51 |
| 4.2.3 | Test de diffusion passive..... | 53 |
| 4.2.4 | Effet de la concentration de ligand sur la prise en charge de l'argent..... | 54 |
| 4.3 | Résultats..... | 55 |
| 4.3.1 | Expérience de type « pulse-chase »..... | 58 |
| 4.3.2 | Effet du chlorure sur la prise en charge du Mn..... | 60 |
| 4.3.3 | Comparaison de l'accumulation d'Ag en présence de chlorure ou de thiosulfate..... | 61 |
| 4.4 | Discussion..... | 62 |
| 4.4.1 | Le transport transmembranaire comme étape limitante..... | 62 |
| 4.4.1.1 | Effet du chlorure sur l'algue..... | 63 |
| 4.4.1.2 | Diffusion passive du complexe $AgCl^0$ | 63 |
| 4.4.1.3 | Transport accidentel par un transporteur anionique..... | 65 |
| 4.4.2 | La diffusion à travers la couche non-mélangée comme étape limitante..... | 66 |
| 4.5 | Conclusion..... | 69 |
| 4.5.1 | Répercussions environnementales..... | 70 |
| 5. | EFFET DU THIOSULFATE..... | 71 |
| 5.1 | Introduction..... | 71 |
| 5.2 | Méthodologie expérimentale..... | 72 |
| 5.3 | Résultats..... | 74 |
| 5.4 | Discussion..... | 77 |
| 5.4.1 | Stimulation de la prise en charge de l'Ag par le thiosulfate chez <i>C. reinhardtii</i> | 77 |
| 5.5 | Conclusion..... | 83 |
| 5.5.1 | Contexte environnemental..... | 84 |
| 6. | TOXICITÉ..... | 87 |
| 6.1 | Introduction..... | 87 |
| 6.2 | Méthodologie et tests préliminaires..... | 89 |
| 6.2.1 | Expériences en lots..... | 89 |
| 6.2.2 | Expériences en turbidostat..... | 89 |
| 6.2.2.1 | Montage..... | 89 |
| 6.2.2.2 | Seuil de détection..... | 91 |
| 6.2.2.3 | Variabilité du signal..... | 91 |
| 6.2.2.4 | Calcul du taux de croissance..... | 93 |
| 6.2.2.5 | Expériences de toxicité..... | 93 |
| 6.3 | Résultats..... | 94 |
| 6.3.1 | Expériences en lots..... | 94 |
| 6.3.2 | Expériences en turbidostat..... | 94 |
| 6.4 | Discussion..... | 98 |
| 6.4.1 | Expériences en lots..... | 98 |
| 6.4.2 | Expériences en turbidostat..... | 99 |
| 6.5 | Conclusion..... | 101 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 7. | CONCLUSION..... | 103 |
| 8. | ANNEXE A : Spéciation de l'argent | 109 |
| 8.1 | Complexation par le chlorure et le thiosulfate | 109 |
| 8.1.1 | Chlorure | 110 |
| 8.1.2 | Thiosulfate | 110 |
| 8.2 | Complexation par le sulfoxine | 111 |
| 8.3 | Complexation par le DIDS | 114 |
| 9. | ANNEXE B : Effet de l'EDTA | 117 |
| 9.1 | Effet de l'EDTA sur les cellules algales (lors de la désorption des métaux) .. | 117 |
| 10. | ANNEXE C : Transport du chlorure | 121 |
| 10.1 | Introduction | 121 |
| 10.2 | Méthodologie..... | 122 |
| 10.3 | Résultats | 123 |
| 10.4 | Discussion | 126 |
| 10.5 | Conclusion..... | 127 |
| 11. | ANNEXE D : Transport du sulfate..... | 129 |
| 11.1 | Cinétique | 129 |
| 11.2 | Voie métabolique et destin du sulfate | 132 |
| 11.3 | Effet de la lumière | 134 |
| 11.4 | Effet du pH | 135 |
| 11.5 | Inhibiteurs..... | 135 |
| 11.5.1 | Inhibiteurs de synthèse de protéines..... | 135 |
| 11.5.2 | Analogues du sulfate | 136 |
| 11.5.3 | Inhibiteurs métaboliques..... | 138 |
| 12. | ANNEXE E : Calculs de transport diffusionnel | 141 |
| 12.1 | Effet de la vitesse de l'algue sur l'épaisseur de la couche diffuse | 141 |
| 12.2 | Effet de l'épaisseur de la couche diffuse sur le taux de diffusion..... | 142 |
| 13. | BIBLIOGRAPHIE..... | 145 |



LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et anions composant le milieu de culture MHSM-1..... | 20 |
| Tableau 2.2 : Concentrations molaires des cations et anions composant le milieu de culture MHSM-2..... | 21 |
| Tableau 2.3 : Compositions et proportions des solutions stock servant à la préparation des milieux de culture MHSM-1 et MHSM-2..... | 23 |
| Tableau 2.4 : Concentrations d'Ag pris en charge ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) par <i>C. reinhardtii</i> (WT) après 10 min d'exposition selon la concentration d'Ag non radioactif présent dans la solution de rinçage..... | 31 |
| Tableau 4.1 : Paramètres d'exposition de l'expérience d'inhibition de prise en charge de l'Ag ⁺ par ajout d'Ag non radioactif | 54 |
| Tableau 4.2 : Prise en charge de l'Ag après 15 minutes d'exposition à des concentrations croissantes de chlorure en fonction de la spéciation calculée (MINEQL+) entre 10 et 40 mM Cl ⁻ (milieu MHSM-2)..... | 57 |
| Tableau 5.1: Conditions d'exposition à l'argent pour chaque expérience. | 73 |
| Tableau 6.1 : Taux de croissance de <i>C. reinhardtii</i> mesuré sur 12 heures en turbidostat en présence (N = 2) et en absence (N = 3) de thiosulfate pour une même concentration d'Ag ⁺ nominale de 30 nM..... | 97 |
| Tableau 6.2 : Bilan des valeurs de toxicité d'Ag connues pour les algues | 102 |
| Tableau A.1 : Constantes de formation et de solubilité de l'Ag utilisées pour effectuer les calculs de spéciation. Les valeurs ont été exprimées et corrigées selon les conventions d'utilisation de MINEQL+ (Fortin et Gauthier, 1995)..... | 109 |
| Tableau A.2 : Concentrations d'Ag ⁺ mesurées par électrode sélective en présence de sulfoxine à pH 7,0..... | 113 |
| Tableau B.1 : Activité en ¹⁴ C de <i>C. reinhardtii</i> avec (WT) et sans (WL) paroi retenues sur un filtre de 2,0 μm . L'erreur représente l'écart-type sur trois mesures. | 117 |
| Tableau B.2 : Reprise de l'activité en ¹⁴ C de <i>C. reinhardtii</i> avec (WT) et sans (WL) paroi retenues sur un filtre de 2,0 μm . L'erreur représente l'écart-type sur six mesures..... | 118 |
| Tableau B.3 : Moyenne d'activité tous traitements confondus (X 1000 DPM•cell. ⁻¹)..... | 119 |
| Tableau D.1 : Tableau récapitulatif des constantes de demi-saturation (K_m) publiées selon les conditions de culture des cellules (temps de carence ou [SO ₄ ²⁻]) et l'espèce utilisée. | 132 |
| Tableau D.2 : Efficacité des analogues du sulfate à inhiber son transport..... | 137 |

Tableau D.3 : Tableau récapitulatif des effets des inhibiteurs métaboliques sur la prise en charge du sulfate en présence de lumière, exprimés en % de $[^{35}\text{SO}_4]_{\text{cell}}$ par rapport au contrôle (100 %). Le chiffre entre parenthèses indique la concentration d'inhibiteur utilisée..... 138

LISTE DES FIGURES

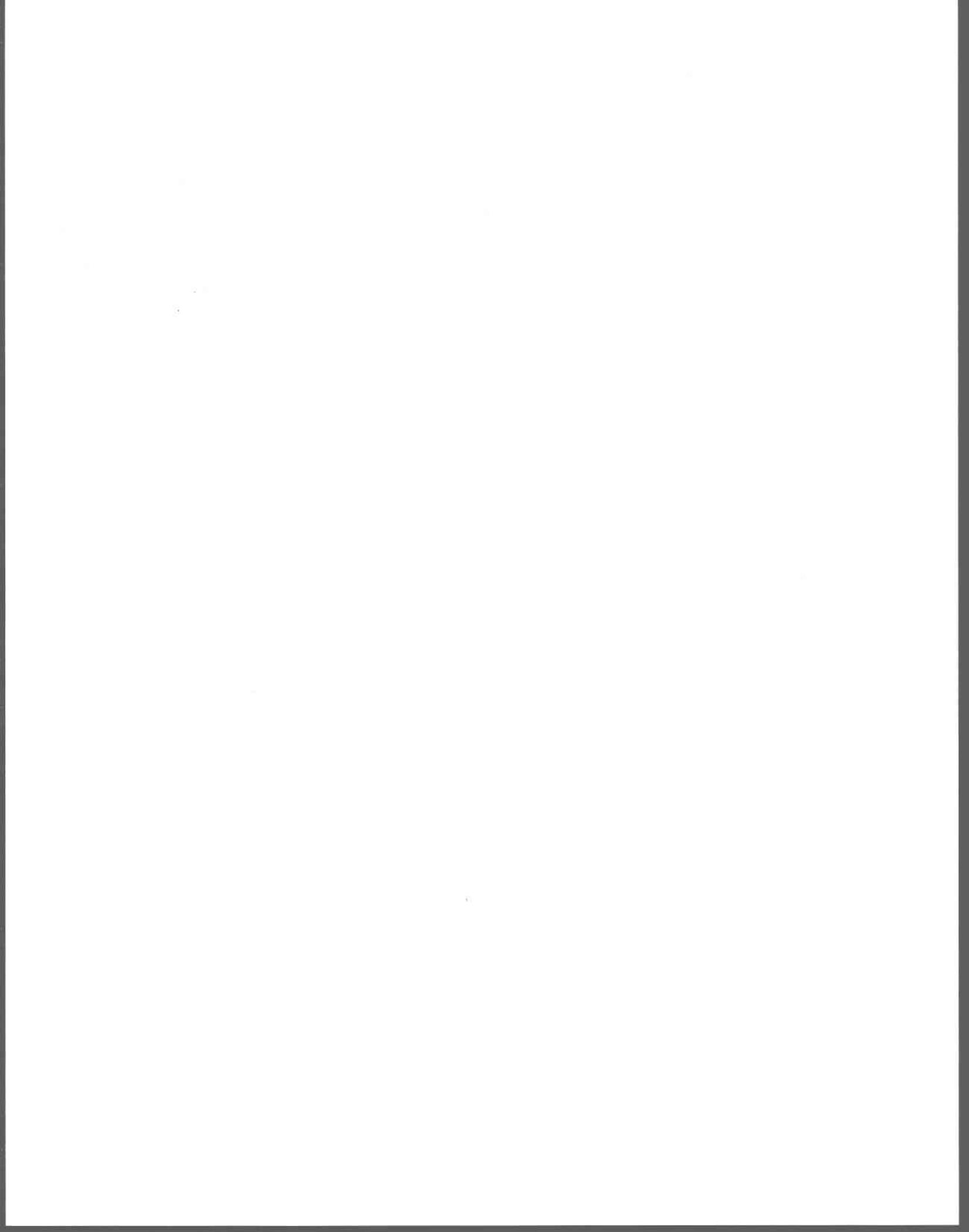
| | | |
|--------------|---|----|
| Figure 1.1 : | Représentation conceptuelle du transport transmembranaire d'un métal non-essentiel : i) par un site de transport spécifique pour les métaux essentiels (ex.: Cu; Zn; Ca); ii) par un site de transport facilité de métabolites (ex.: Z = acide aminé) ou d'anions (ex.: Z = Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻); iii) par diffusion passive de formes neutres. | 14 |
| Figure 2.1 : | Comparaison de la croissance de <i>C. reinhardtii</i> (souche autochtone) en milieu HSM (∇) et en milieu MHSM-1 (○). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de dix mesures. | 22 |
| Figure 2.2 : | Croissance de la population des souches mutante (UTCC 12) et autochtone (UTCC 11) de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> lorsque cultivées dans un milieu contenant 50, 75, 100 ou 125 mM KCl. | 22 |
| Figure 2.3 : | Courbe de croissance typique de <i>C. reinhardtii</i> . Encadré : fenêtre expérimentale. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures. | 26 |
| Figure 2.4 : | Activité de l'Ag dans le filtrat en fonction du volume total de rinçage lors d'une exposition de 10 min à 10 nM Ag ⁺ . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. | 30 |
| Figure 2.5 : | Efficacité de désorption de l' ^{110m} Ag selon la concentration d'Ag dans la solution de rinçage et effet du temps d'attente des cellules avant l'exposition (20 min entre chaque rinçage) sur la prise en charge de l' ^{110m} Ag. | 32 |
| Figure 2.6 : | Comparaison des résultats de prise en charge de l'argent (10 nM Ag ⁺ ; 5 μM Cl ⁻) après 10 min d'exposition selon le type de rinçage (100 nM Ag ⁺ vs 10 μM S ₂ O ₃ ²⁻). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures. | 33 |
| Figure 2.7 : | Comparaison des résultats de prise en charge de l'argent (10 nM Ag ⁺ ; 4 mM Cl ⁻) après 10 min d'exposition selon le type de rinçage (100 nM Ag ⁺ vs 10 μM S ₂ O ₃ ²⁻). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures. | 34 |
| Figure 3.1 : | Prise en charge de l'Ag par <i>C. reinhardtii</i> selon la concentration d'Ag ⁺ à pH 7, après 10 minutes d'exposition dans le milieu MHSM-1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. | 40 |
| Figure 3.2 : | Cinétique de prise en charge de l'Ag par <i>C. reinhardtii</i> en présence d'une concentration nominale de 10 nM Ag ⁺ en milieu MHSM-1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures. | 41 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Figure 3.3 : | Effet de l'agitation des flacons d'exposition (50 rpm) sur la cinétique de prise en charge de l'Ag à 8 nM Ag _{mes} . (● : sans agitation; ○ : avec agitation). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 42 |
| Figure 3.4 : | Prise en charge de l'Ag en fonction du temps et du régime lumineux (● : obscurité; ○ : lumière) chez <i>C. reinhardtii</i> lors d'une exposition à 10 nM Ag ⁺ , à haute (4 mM; courbes du haut) et faible (5 μM; courbes du bas) concentrations de chlorure. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 43 |
| Figure 3.5 : | Effet de certains métaux de transition (500 nM) sur la prise en charge de l'Ag (10 nM; 12 min). (A) Effet du Cu, du Zn et du Ni à pH 5. (B) Effet du Cd, du Mn et du Co à pH 7. Les contrôles représentent la prise en charge d'Ag en absence de ces métaux. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. | 44 |
| Figure 3.6 : | Cinétique de la prise en charge de l'Ag ⁺ (10 nM) dans les milieux MHSM-1 (●) et MHSM-2 (○) dont les concentrations de K ⁺ sont respectivement de 4 et 100 mM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 45 |
| Figure 4.1 : | Ordre séquentiel des manipulations lors de l'expérience de type « pulse-chase »..... | 52 |
| Figure 4.2 : | Cinétique de prise en charge de l'Ag à concentration d'Ag ⁺ constante (9 nM) à faible (● : 5 μM Cl) et à haute (○ : 4 mM Cl) concentrations de chlorure. (A) Prise en charge à faible force ionique (milieu MHSM-1; I = 6 meq•L ⁻¹); (B) Prise en charge à haute force ionique (milieu MHSM-2; I = 100 meq•L ⁻¹). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 56 |
| Figure 4.3 : | Accumulation d'Ag à temps court (15 min) en fonction de pCl (- log {Cl ⁻ }) à 10 nM (●, ○) et 115 nM (▼) Ag _T (échelle de droite). Distribution des différentes espèces d'Ag calculée en fonction de pCl à l'aide de MINEQL+ (courbes se référant à l'échelle de gauche). Les symboles noirs désignent les résultats obtenus avec la même culture d'algues. Les lignes pointillées représentent les régressions linéaires des données. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 57 |
| Figure 4.4 : | Modèle conceptuel des interactions entre l'Ag et la membrane plasmique d'une algue en présence de chlorure. En haut : liaison de l'argent avec un système de transport (ellipse). En bas : diffusion passive du complexe neutre, présumé être lipophile, à travers la bicouche lipidique..... | 58 |
| Figure 4.5 : | Accumulation intracellulaire d' ^{110m} Ag avec et sans resuspension après 15 minutes lors de l'expérience « pulse-chase ». (A) : Cellules de référence non manipulées. (B) : Cellules récoltées et resuspendues dans leur filtrat radioactif. (C) : Cellules récoltées et resuspendues en | |

- milieu non radioactif (courbe hypothétique si k_{-1} et $k_{-2} \ll k_{int}$). (D) : Cellules récoltées et resuspendues en milieu non radioactif (courbe observée). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.....59
- Figure 4.6 : Effet de l'ajout d'un excès d'argent non radioactif sur la prise en charge de l' ^{110m}Ag par *C. reinhardtii*. Chaque milieu avait une concentration d' $^{110m}\text{Ag}^+$ de 2 nM. Le milieu A contenait peu de chlorure (5 μM) et une concentration totale d' ^{110m}Ag de 2 nM. Le milieu B contenait 4 mM de chlorure et une concentration totale d' ^{110m}Ag de 21 nM. Le milieu C était identique au milieu B à l'exception d'un ajout d'Ag non radioactif de 414 nM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures. La ligne pointillée fait référence au niveau de prise en charge d' ^{110m}Ag attendu dans le milieu C si la différence entre A et B était due à la présence d'un mécanisme de diffusion passive (voir Discussion).60
- Figure 4.7 : Prise en charge du Mn dans le milieu MHSM-1 en fonction du temps. L'astérisque (*) indique une différence statistique significative entre les milieux de haute (\circ) et faible (\bullet) concentrations en chlorure à $t \geq 43$ min (test de Student; $P < 0,05$).61
- Figure 4.8 : Prise en charge de l'argent en fonction de la concentration de ligand. (A) Concentration de chlorure variable (5 μM à 4 mM), $t = 10$ min et $[\text{Ag}^+] = 8$ nM; (B) Concentration de thiosulfate variable (0 à 114 nM), $t = 12$ min et $[\text{Ag}^+] = 10$ nM; et (C) Concentration de thiosulfate variable (0 à 10 μM), $t = 12$ min et $[\text{Ag}^+] = 10$ nM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.62
- Figure 5.1: Prise en charge de l'argent en fonction du temps à une concentration d' Ag^+ constante (10 nM). (A) Prise en charge à faible concentration de chlorure en présence de thiosulfate mais en absence de sulfate. (B) Prise en charge à faible concentration de chlorure en présence de thiosulfate et de sulfate. (C) Prise en charge à haute concentration de chlorure en absence de thiosulfate. (D) Prise en charge à faible concentration de chlorure en absence de thiosulfate (données provenant de la figure 3.6). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. L'inséré représente les courbes de cinétique d'accumulation B, C et D sur une échelle plus petite.74
- Figure 5.2 : Effet de la concentration ambiante de sulfate dans le milieu d'exposition sur la prise en charge de l'argent à concentrations d' Ag^+ et d' Ag_T constantes en présence de thiosulfate (\bullet) ou de chlorure (\blacktriangle) comme ligand (milieux E et F). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.75
- Figure 5.3 : Comparaison de la prise en charge d'Ag de quatre milieux expérimentaux contrastants après 15 minutes d'exposition à 10 ou 104 nM Ag^+ (\blacktriangledown) et 104 nM Ag_T (\square). (G) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en présence de thiosulfate (114 nM)

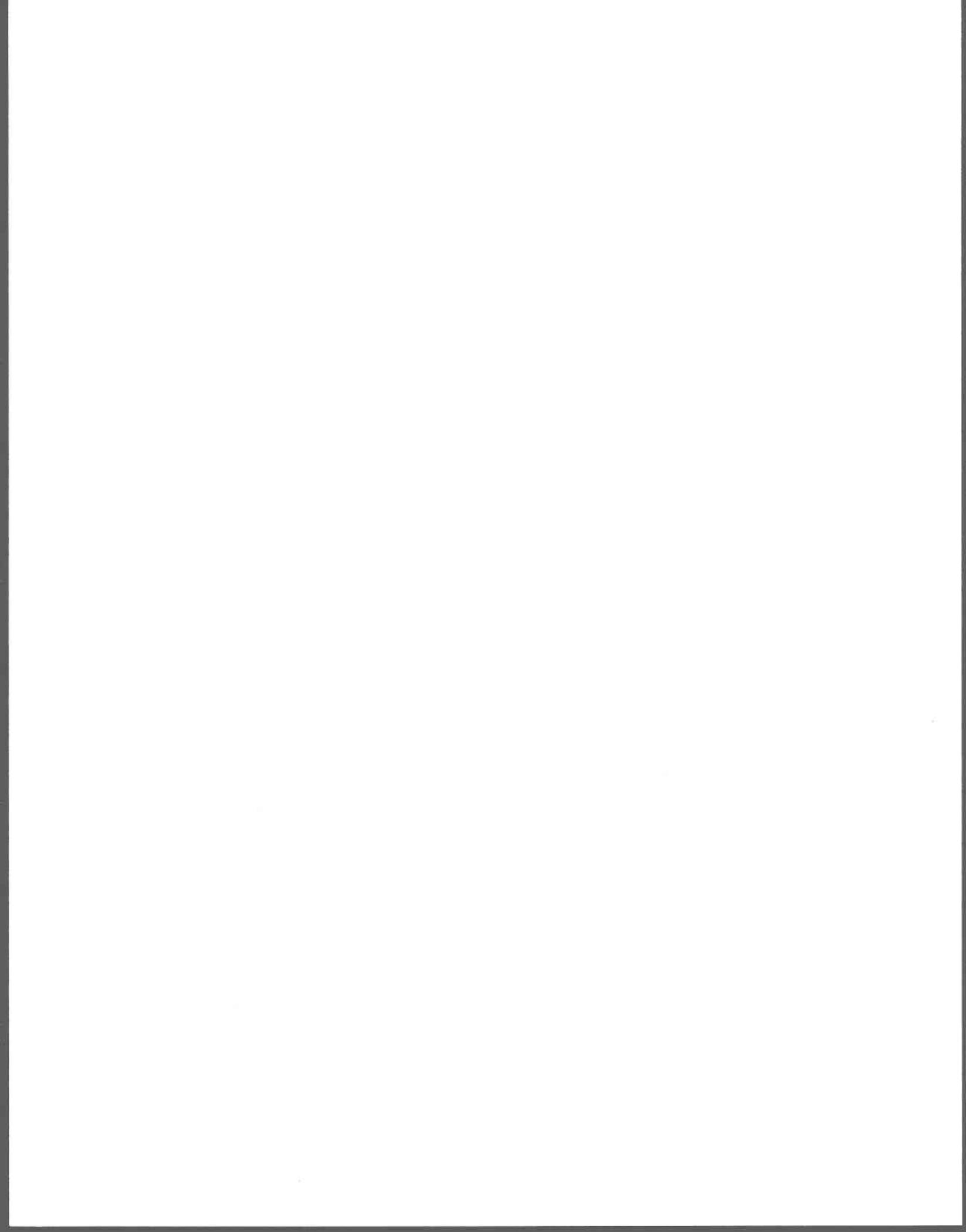
| | | |
|--------------|--|-----|
| | mais en absence de sulfate. (H) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en absence de thiosulfate et de sulfate (milieu sans complexation, utilisé pour fins de comparaison). (I) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en présence de thiosulfate (114 nM) et de sulfate (120 μM). (J) Prise en charge à haute concentration de chlorure (4 mM) en absence de thiosulfate et de sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 76 |
| Figure 5.4 : | Prise en charge de l'argent en fonction de la concentration d' Ag^+ lorsque Ag_T est constant mais thiosulfate variable (sur une échelle logarithmique en médaillon). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. | 77 |
| Figure 5.5 : | Modèle conceptuel du transport de l'Ag chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en présence de thiosulfate..... | 81 |
| Figure 5.6 : | Prise en charge de l'argent en fonction du ratio des concentrations de thiosulfate libre et du complexe argent-thiosulfate lorsque Ag_T est constant mais thiosulfate variable. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 83 |
| Figure 6.1 : | Schéma illustrant le montage du turbidostat..... | 90 |
| Figure 6.2 : | Exemple de l'évolution du signal du turbidostat sur plusieurs jours en absence d'algues. | 92 |
| Figure 6.3 : | Calibrage du turbidostat en fonction de la densité cellulaire. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. | 92 |
| Figure 6.4 : | Effet de l'Ag sur la croissance de <i>C. reinhardtii</i> (sans paroi) en culture par lots. (A) Densité cellulaire en fonction du temps ($\circ = 10 \text{ nM Ag}^+$; $\bullet =$ témoin sans ajout d'Ag; $N = 5$). (B) Concentration de l'Ag « dissous » en fonction du temps. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures. | 95 |
| Figure 6.5 : | Toxicité de l'Ag sur la croissance de <i>C. reinhardtii</i> (avec paroi) en culture par lots. (A) Densité cellulaire en fonction du temps ($\circ = 10 \text{ nM Ag}^+$; $\bullet =$ témoin sans ajout d'Ag; $N = 5$). (B) pH des milieux en fonction du temps tous traitements confondus ($N = 10$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures..... | 96 |
| Figure 6.6 : | Taux de croissance relatif de <i>C. reinhardtii</i> par rapport aux témoins, mesuré sur 12 heures en turbidostat en fonction de la concentration d'Ag ajoutée. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... | 97 |
| Figure A.1 : | Spéciation de l'Ag selon la concentration de chlorure calculée à l'aide du logiciel MINEQL+..... | 110 |
| Figure A.2 : | Spéciation de l'Ag selon la concentration de thiosulfate calculée à l'aide du logiciel MINEQL+..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| Figure A.3 : Calibrage de l'électrode sélective à l'ion Ag^+ en fonction de la concentration d' Ag^+ | 112 |
| Figure A.4 : Structure moléculaire du sulfoxine..... | 112 |
| Figure A.5 : Effet du pH sur la complexation de l'Ag (9 μM) par le sulfoxine (1 mM), tel que mesuré par une électrode sélective à l'ion Ag^+ . La courbe représente la concentration d' Ag^+ calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ en utilisant une constante de formation de $10^{4,7}$ pour le complexe AgSox..... | 113 |
| Figure A.6 : Structure moléculaire du DIDS..... | 114 |
| Figure A.7 : Effet de la concentration de l'inhibiteur DIDS sur la concentration d' Ag^+ à concentration fixe d' Ag_T (1 μM) à pH 7,0, telle que mesurée à l'aide d'une électrode sélective..... | 115 |
| Figure A.8 : Effet du pH sur la concentration d' Ag^+ en présence de 32 μM de DIDS et 1 μM d' Ag_T , telle que mesurée à l'aide d'une électrode sélective..... | 115 |
| Figure C.1 : Structure moléculaire du DCMU (à gauche) et de l'A-9-C (à droite). | 122 |
| Figure C.2 : Effet du DCMU et du DIDS (en prétraitement seulement ou exposition conjointe au Cl^-) sur la prise en charge du $^{36}\text{Cl}^-$ après 33 minutes. Les colonnes hachurées représentent les expériences réalisées dans l'obscurité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. | 124 |
| Figure C.3 : Effet de l'A-9-C et du pré-traitement des cellules à l'A-9-C (100 μM) ou au DIDS (350 μM) sur la prise en charge du chlorure. La colonne hachurée représente une expérience réalisée dans l'obscurité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. | 124 |
| Figure C.4 : Effet relatif de la concentration de DIDS ajoutée dans l'obscurité sur la prise en charge du chlorure ($t = 33 \text{ min}$) par rapport au témoin à la lumière. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. La prise en charge de chlorure à 100 μM DIDS est tirée de la figure C.2. | 125 |
| Figure E.1 : Épaisseur de la couche diffuse (δ) en fonction du rapport vitesse : rayon (s^{-1}) selon l'équation de Levich. | 142 |
| Figure E.2 : Flux à travers la couche limite en fonction de l'épaisseur de la couche diffuse selon l'équation (4.1) pour une concentration externe de 8 nM (C_b) et nulle à la surface (C_s). | 143 |



LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|---|
| CE50 : | Concentration ayant un effet sur 50 % de la population testée |
| Chl a : | Chlorophylle a |
| CI50 : | Concentration inhibant la croissance de 50 % |
| CL50 : | Concentration létale envers 50 % de la population testée |
| CPM : | Comptes par minute |
| DDC : | Diéthylthio-carbamate |
| DIDS : | 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2-2'-disulfonate |
| DPM : | Désintégrations par minute |
| EDTA : | Acide éthylènediamine-tétraacétique |
| HDPE : | Polyéthylène à haute densité |
| HSM : | <i>High salt medium</i> |
| I : | Force ionique |
| k : | Constante de cinétique |
| k _w : | Constante de cinétique d'échange d'une molécule d'eau |
| K : | Constante d'équilibre chimique |
| K _I : | Constante d'inhibition |
| K _m : | Constante de demi-saturation |
| K _{ow} : | Coefficient de partage octanol – eau |
| L : | Ligand |
| M ^{Z+} : | Ion métallique libre |
| MHSM : | <i>Modified high salt medium</i> |
| MIL : | Modèle de l'ion libre |
| MOD : | Matière organique dissoute |
| NIST : | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| NTA : | Acide nitrilotriacétique |
| PPCO : | Polypropylène copolymère |
| Sox : | Sulfoxine (8-hydroxyquinoline-5-sulfonate) |
| TFE : | Tétrafluoroéthylène |
| USEPA : | <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| UTCC : | <i>University of Toronto Culture Collection</i> |
| V _{max} : | Vitesse maximale d'entrée |
| WL : | <i>Wall-less</i> |
| WT : | <i>Wild type</i> |



1. INTRODUCTION

L'argent a été identifié depuis longtemps comme un élément très toxique et relativement accessible (Wood, 1976). En effet, la mobilisation de cet élément causée par l'activité humaine est très importante. La demande mondiale pour ce métal a presque doublé entre 1980 et 1993 passant de 11 800 à 21 100 tonnes et demeure en progression constante (Mukherjee, 1997). Les industries minières, métallurgiques, électroniques et surtout photographiques contribuent largement aux apports anthropiques de l'Ag dans l'environnement. La majorité de l'argent extrait est toutefois destiné à la fabrication de bijoux et de coutelleries. Les autres utilisations de l'argent consistent en la fabrication de miroirs, de pièces de monnaie, de piles, d'amalgames dentaires, de fongicides et de médicaments topiques (Nielsen et Massey, 1940; Mukherjee, 1997; Purcell et Peters, 1998).

À ce jour, l'Ag n'a fait l'objet que de peu d'études écotoxicologiques comparativement à d'autres éléments toxiques tels le Cu, le Cd ou le Hg. Cette recherche vise donc à combler, en partie, cette lacune.

1.1 L'argent dans l'environnement

La mobilisation anthropique de l'argent est, comparativement à celle d'autres métaux, préoccupante. En effet, la concentration moyenne de l'Ag dans la croûte terrestre est de $\sim 0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ alors que les concentrations moyennes dans les boues d'épuration sont de l'ordre de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, soit un facteur de concentration de 200 (Wittmann, 1981; Mukherjee, 1997). De même, les données de Galloway *et al.* (1982), obtenues à la fin des années 1970, indiquent que les émissions atmosphériques d'origine anthropique (combustion de combustibles fossiles, incinération de déchets) étaient de 80 fois supérieures aux émissions naturelles d'Ag dans l'atmosphère (poussières provenant du sol ou d'éruptions volcaniques). Il semble également que les concentrations d'Ag retrouvées dans les précipitations (neige et pluie) soient reliées à l'activité humaine. Dans cette même étude, la teneur en Ag dans les précipitations était 460 fois plus élevée en milieu

urbain et 8 fois en milieu rural qu'en région éloignée (Galloway *et al.*, 1982). L'argent est d'ailleurs utilisé en certains endroits pour provoquer des précipitations atmosphériques (Cooper et Jolly, 1970). L'ensemble de ces activités humaines ont donc une répercussion importante sur les concentrations d'Ag dans les lacs, rivières, estuaires et océans, tout spécialement dans les zones densément peuplées. À titre d'exemple, en 1994, la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Montréal a déversé 3,3 tonnes d'argent dans le fleuve Saint-Laurent (Gingras, 1997).

De façon générale, les concentrations d'Ag mesurées dans les eaux naturelles avant le début des années 80 étaient surestimées. L'élaboration de protocoles ultra-propres et de méthodes de dosage plus sophistiquées ont permis d'établir un portrait plus réaliste de la situation. Dans les eaux douces, les concentrations d'Ag peuvent varier entre 1 et 300 pM (Betti et Papoff, 1988) mais on a aussi observé des teneurs allant jusqu'à 3 nM en aval de zones urbaines et industrielles (rivière Quinnipiac : Benoit, 1994; rivière Asakawa : Yamazaki *et al.*, 1996). Deux estuaires ont été particulièrement étudiés, celui de la baie de San Francisco et celui de Long Island Sound. À ces deux endroits, la gamme de concentrations d'Ag mesurées étaient respectivement de 10 à 90 pM et de 35 à 41 pM (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Martin *et al.* (1983) ont quant à eux établi un profil de concentration d'Ag en fonction de la profondeur dans l'océan Pacifique. Ce profil indiquait une augmentation de la présence de l'Ag en profondeur, passant de 0,4 à 23 pM, avec une certaine variabilité près de la surface. Cette variation à la surface a pu être reliée au cycle du carbone. En effet, les mesures de fluorescence effectuées dans les premiers 700 mètres de profondeur indiquaient une activité biologique maximale aux environs de 60 mètres, ce qui correspondait au minimum d'Ag dissous mesuré. Les auteurs en déduisent que l'Ag est associé aux micro-organismes et que, lors de la mort et la lyse de ces cellules, une partie de l'Ag est remobilisée avec la matière organique.

1.1.1 Spéciation de l'Ag en milieu aquatique

En absence d'espèces de soufre réduit, la spéciation de l'argent en solution est fortement influencée par deux ligands inorganiques simples, le chlorure et le thiosulfate, formant une série de complexes stables (AgCl^0 , AgCl_2^{-1} : $\log K_1 = 3,31$, $\log \beta_2 = 5,25$; AgS_2O_3^- , $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$: $\log K_1 = 8,82$, $\log \beta_2 = 13,50$; Martell *et al.*, 1998; voir annexe A).

L'ubiquité du chlorure dans les lacs et rivières est bien connue, avec des concentrations variant typiquement de 10^{-5} à 10^{-3} M (Buffle et Stumm, 1994) ou même plus dans le cas d'effluents industriels ou d'eaux de ruissellement urbain. En absence de thiols ou de sulfures, le chlorure risque de contrôler la spéciation de l'Ag dans les milieux où sa concentration est particulièrement élevée, tels les estuaires et océans (Miller et Bruland, 1995), mais aussi dans les eaux douces lorsque sa concentration atteint les 10^{-4} M. L'argent est d'ailleurs très peu soluble en présence de chlorure ($K_{sp} = 10^{-9,75}$; Martell *et al.*, 1998).

Le thiosulfate est présent en très grande quantité dans les effluents des industries photographiques (Purcell et Peters, 1998). Il est toutefois moins abondant en milieu naturel mais on le retrouve en concentration appréciable dans les eaux interstitielles (suboxiques) des sédiments (Luther *et al.*, 1985, 1986a, b; Valravamurthy et Mopper, 1990; Thamdrup *et al.*, 1994; Ciglenecki et Cosovic, 1997) ainsi que dans les eaux usées reliées aux procédés de flottation de minerais de sulfures et dans les eaux de drainage minier acide (Druschel *et al.*, 1999). Contrairement au chlorure, le thiosulfate n'a pas besoin d'être présent en concentration élevée pour influencer significativement la spéciation de l'Ag; par exemple, pour une concentration de 1 nM Ag, il suffit de 20 nM de thiosulfate pour obtenir plus de 90 % de complexation.

Par ailleurs, cette perception du rôle important du chlorure et du thiosulfate dans la spéciation de l'Ag a été récemment bouleversée par la découverte de la persistance d'espèces de soufre réduit en eaux oxiques naturelles malgré leur instabilité thermodynamique inhérente en présence d'oxygène (Rozan et Benoit, 1999; Rozan *et al.*, 1999; Adams et Kramer, 1999a; Rozan *et al.*, 2000). La concentration de ces composés à

l'état stationnaire serait suffisamment élevée pour complexer pratiquement tout l'Ag présent, à condition que la cinétique soit relativement rapide, ce qui semble être le cas (Rozan *et al.*, 2000). L'affinité de l'argent pour les sulfures est très élevée, formant des complexes très stables (AgHS^0 , $\text{Ag}(\text{HS})_2^{-1}$: $\log K_1 = 14,0$, $\log \beta_2 = 17,7$). Notons que la solubilité de l'acanthite, $\text{Ag}_2\text{S}^0_{(s)}$, est très faible ($\log K_{sp} = 10^{-35,94}$; Adams et Kramer, 1998).

La dernière classe de ligands à considérer est la famille de ligands organiques. Peu d'études ont porté sur la complexation de l'argent par la matière organique dissoute (MOD) naturelle. L'argent étant un métal « mou », on peut s'attendre à ce que son affinité pour les groupements phénoliques et carboxyliques des acides humiques et fulviques soit relativement faible et qu'il démontre plutôt une affinité pour les groupements thiols, présents en très faible quantité dans la MOD. Whitlow et Rice (1985) ont échantillonné deux rivières de l'État de New York ($[\text{Cl}^-] \approx 370 \mu\text{M}$) afin de mesurer la complexation de l'Ag par titrage ($0,4 - 6,0 \mu\text{M Ag}_T$) à l'aide d'une électrode sélective. Les résultats ont démontré qu'une faible partie (5 à 16 %) de l'Ag en solution était complexé par la MOD et / ou la matière colloïdale, les formes dominantes étant AgCl^0 et Ag^+ . De même, Cowan *et al.* (1985), toujours à l'aide d'une électrode sélective, n'a détecté aucune complexation significative par la MOD en eau de mer. Plus récemment, Miller et Bruland (1995) ont répété ce genre d'expérience, à l'aide d'une technique d'extraction au diéthyl-dithiocarbamate et chloroforme (*competitive ligand exchange method*) permettant de travailler à des concentrations très faibles d'Ag ($0,010 - 1 \text{ nM}$). Toutefois, ces titrages à l'Ag n'ont révélé aucune complexation significative par la MOD, le chlorure contrôlant fortement la spéciation. Il faut souligner, cependant, que leurs échantillons avaient séjourné pendant un an dans un congélateur avant les expériences de titrage.

1.2 Toxicité et bioaccumulation de l'argent

Bien que l'Ag ait été l'objet de moins d'études que le Cd ou le Cu, on retrouve malgré tout plusieurs études de toxicité et / ou de bioaccumulation de l'Ag chez divers organismes aquatiques. Il est toutefois difficile de comparer globalement ces études puisque la réponse biologique recherchée par les auteurs (mortalité, accumulation,

croissance, photosynthèse, etc.), les paramètres d'exposition et les espèces utilisées diffèrent grandement. Les effets de l'argent sur les organismes aquatiques et terrestres ont déjà fait l'objet de quelques revues de la littérature (USEPA, 1987; Eisler, 1996; Ratte, 1998). Nous ne reprendrons donc que les principales études consacrées aux organismes aquatiques.

1.2.1 Algues

Les travaux de Fisher *et al.* (1984) portaient sur l'accumulation et la toxicité de divers métaux dont l'Ag chez quatre types d'algues marines : *Dunaliella tertiolecta*, *Emiliana huxleyi*, *Oscillatoria woronichinii* et *Thalassiosira pseudonana*. On y retrouve des résultats sur l'accumulation intracellulaire en fonction de la concentration de métal en solution et sur les effets de la concentration (dissoute et accumulée) sur la croissance des algues. À partir de ces données, les auteurs ont pu déterminer des valeurs de CI50 (concentration de métal qui provoque une inhibition de la croissance de 50 %) variant entre 79 nM et 25 µM d'Ag et de CI0 (concentration inhibant toute croissance) entre 0,4 et 63 µM d'Ag. Signalons cependant que ces auteurs n'ont pas tenu compte de la spéciation de l'Ag dans leurs milieux de culture. L'année suivante, des résultats similaires ont été publiés avec le picoplancton *Synechococcus*, où le facteur de concentration volumique (VCF : *volume concentration factor*) de différents métaux a été mesuré et comparé aux résultats précédents dans le but de mieux comprendre le rôle du picoplancton dans le cycle des métaux (Fisher, 1985).

L'étude de Stokes (1981) cherchait à comprendre les mécanismes de tolérance en comparant une algue, *Scenedesmus acutiformis*, qui avait été isolée d'un lac dont les teneurs en Cu et Ni étaient élevées, avec une algue similaire, *Scenedesmus acuminatus*, cultivée en laboratoire. Ainsi, le CI50 de l'algue isolée du lac contaminé était supérieur (0,19 µM Ag) à celui de la souche cultivée au laboratoire (0,07 µM Ag). Cette dernière était donc plus sensible à la présence de l'Ag. Toutefois, de façon générale, les résultats n'ont pu démontrer une co-tolérance de la souche autochtone pour les métaux (Ag, Au, Pb, Zn, Co, Cd) autres que le Cu et le Ni.

Dans une des rares études où on a tenu compte de la spéciation des métaux en solution lors des expositions, Canterford et Canterford (1980) ont utilisé l'algue marine *Ditylum brightwellii* afin d'étudier l'influence de l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA) sur la toxicité du zinc, du plomb, du cuivre, du mercure, du cadmium, du thallium et de l'argent. Malgré une augmentation de l'EDTA de 0,67 à 2,6 puis à 10 μM , aucune différence n'a été observée dans l'inhibition de la croissance de l'algue entre 0 et 550 nM Ag. En fait, la spéciation de l'Ag dans le milieu de culture utilisé était contrôlée par le chlorure et l'influence de l'EDTA sur la spéciation était pratiquement nulle. Les résultats obtenus avec les autres métaux étaient toutefois concluants.

Deux articles concernant l'accumulation de l'Ag par l'algue *Scenedesmus obliquus* nous donnent une information limitée. En effet, Garnier et Baudin (1989) ainsi que Sary *et al.* (1983) ne mentionnent nullement les concentrations d'Ag utilisées. Les premiers auteurs ont exprimé tous leurs résultats en terme d'activité d' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ sans mentionner l'activité spécifique de la solution d'Ag. Ils ont néanmoins observé une disparition plus rapide de l'ajout d'Ag au fur et à mesure que la culture vieillissait. Quant à Sary *et al.*, ils ont déterminé une constante de demi-saturation d'environ 5 μM pour l'Ag (K_m : concentration à laquelle le transport transmembranaire est saturé à 50 % par un élément). Signalons de nouveau, cependant, que cette constante de demi-saturation est exprimée en termes de la concentration d'Ag_T nominale, sans distinction des espèces d'Ag présentes dans les solutions d'exposition.

Par une approche morphologique qualitative, Ballan-Dufrançais *et al.* (1991) ont examiné la structure interne de l'algue marine *Tetraselmis suecica* après une exposition de cinq jours à une concentration d'Ag de 185 nM. Ceci a permis d'identifier certains sites où les métaux étaient emmagasinés. Un entreposage à l'intérieur de vésicules serait associé à un processus de détoxification selon les auteurs.

Rai et Raizada (1985) ont étudié l'influence du Ca et de l'EDTA sur la mortalité, la croissance, la nitrogénase et la respiration de *Nostoc muscorum* (algue marine) lors d'expositions à différentes concentrations de Ni et d'Ag. Des concentrations nominales

d'Ag variant entre 13 et 52 nM ont été utilisées en présence ou en absence de 181 μM de Ca ou de 34 μM d'EDTA. Le taux de croissance des algues sur 15 jours diminuait avec l'augmentation de la concentration d'Ag, la croissance par rapport au contrôle étant de 100, 68, 55 et 39 % respectivement pour des concentrations d'Ag de 0, 13, 26 et 52 nM. L'ajout de Ca ou d'EDTA avec l'Ag n'a eu que peu d'effet, permettant d'obtenir des taux de croissance supérieurs de 10 à 20 %.

Le USEPA (1987) a déterminé les CE50 de l'argent chez deux algues, *Selenastrum capricornutum* (algue verte) et *Skeletonema costatum* (diatomée). La croissance de la première espèce s'est avérée être beaucoup plus sensible que celle de la seconde sur une période de 96 h avec respectivement des CE50 de 24 nM et 1,6 μM , ces deux estimés étant basés sur l'évolution temporelle des concentrations de Chl *a*. En utilisant le nombre de cellules comme paramètre de toxicité plutôt que la concentration de Chl *a*, la CE50 pour *Skeletonema costatum* était sensiblement inférieure, passant de 1,6 μM à 1,2 μM . Quant à Turbak *et al.* (1986), ils ont obtenu une CE50 de 59 nM pour *Selenastrum capricornutum* lors d'expositions à plus long terme (14 – 21 jours).

Les travaux de Sanders et Cibik (1988) ont porté sur l'influence de l'Ag et de l'As sur la distribution de différentes espèces d'algues dans la baie de Chesapeake dans l'état du Maryland (salinité de 11,5 à 13,5 ‰). Pendant 20 jours, la croissance de trois algues en compétition (*Skeletonema costatum*, *Anacystis marina* et *Rhizosolenia fragilissima*) a été suivie en enclos en présence de 0, 18, 46 et 65 nM Ag. Les enclos étaient d'abord remplis d'eau de la rivière Patuxent filtrée à 35 μm , pour ensuite répertorier les espèces de phytoplancton présentes. Les enclos étaient par la suite dilués à un rythme de 50 % par jour en utilisant à nouveau l'eau de la rivière filtrée à 1 μm , à laquelle était ajouté différentes concentrations nominales d'Ag. L'augmentation de la concentration d'argent a affaibli la présence de *R. fragilissima* mais surtout celle de *A. marina* qui, à 65 nM Ag, était pratiquement absente du portrait et ce au profit de *S. costatum* qui semble beaucoup plus résistante.

Reinfelder et Chang (1999) ont récemment étudié l'accumulation totale de l'Ag chez la diatomée euryhaline *Thalassiosira weissflogii* en fonction de la concentration ambiante de chlorure en présence d'une très faible concentration d'Ag (50 pM). L'accumulation d'Ag sur une période de quatre heures indiquait une plus grande vitesse initiale en présence d'une concentration intermédiaire de Cl⁻ de 5 mM comparativement à celle observée à 0,5 et 50 mM Cl⁻. Ce pic de vitesse d'accumulation coïncidait avec l'apogée de l'espèce neutre AgCl⁰ dans la distribution des espèces d'Ag. Les auteurs ont conclu que cette espèce pouvait entrer dans les cellules par diffusion passive. Notons toutefois que la prise en charge et l'adsorption n'étaient pas différenciées, ce qui complique l'interprétation de ces données.

L'étude de Bringmann et Kühn (1980) visait à déterminer la concentration maximale de 156 différents polluants sans affecter sensiblement la population (*threshold toxicity*) de trois organismes : une bactérie (*Pseudomonas putida*), une algue verte (*Scenedesmus quadricauda*) et un protozoaire (*Entosiphon sulcatum*). Dans le cas de l'argent, les concentrations limites respectives pour les trois organismes étaient : 56, 88 et 5400 nM. Toutefois, les temps et milieux d'exposition étaient différents dans chaque cas, ce qui rend la comparaison difficile.

1.2.2 Invertébrés

Dans une comparaison inter-laboratoire, Nebeker (1982) a analysé les résultats de CE50 (48 heures et 21 jours) pour le zooplancton *Daphnia magna*. Les tests devaient être conformes aux normes du USEPA (*United States Environmental Protection Agency*). Les valeurs obtenues étaient, dans certains cas, très différentes à cause des écarts de dureté et de pH de l'eau de deux laboratoires. Les CE50 estimées pour l'argent variaient donc entre 5,6 et 510 nM pour les essais sur 48 heures et entre 15 et 380 nM sur 21 jours.

Un autre exemple d'utilisation de zooplancton pour des tests avec l'argent vient de Fisher *et al.* (1995). Dans cette recherche, les auteurs ont utilisé le cilié *Fabrea salina* dans des conditions d'eau saumâtre pour suivre sur 25 heures l'accumulation d'argent et de plomb par la nourriture (algues radiomarquées; [Ag] ≈ 0,55 nM) ou par l'eau ([Ag] = 33 nM).

Les résultats obtenus indiquaient que l'accumulation de l'argent à partir de l'eau était très rapide puis atteignait un plateau alors que l'accumulation provenant de la nourriture se faisait beaucoup plus graduellement.

Parallèlement, Rodgers *et al.* (1997) ont entrepris une étude de toxicité de l'argent sur cinq différents organismes : deux cladocères (*Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna*), un amphipode (*Hyallela azteca*), une larve d'insecte (*Chironomus tentans*) et un poisson (*Pimephales promelas*). Ces chercheurs ont déterminé les CL50 (concentration létale où l'on retrouve 50 % de mortalité) pour tous ces organismes (sur 96 heures et 10 jours), et ce en présence ou en absence de ligand (chlorure et thiosulfate). Les résultats obtenus en absence de ligand indiquaient que la larve d'insecte était l'organisme le plus résistant à l'Ag avec un CL50 de 6,3 μM (96 hrs) et de 2,4 μM (10 jrs) alors que pour tous les autres organismes ces valeurs oscillaient entre 8,5 et 110 nM. En présence de chlorure (concentration pas spécifiée) et de thiosulfate (440 μM), les auteurs n'ont pu déterminer de CL50 à cause d'une mortalité insuffisante, et ce même à des concentrations très élevées (18 μM dans le milieu chlorure et 110 μM dans le milieu thiosulfate).

1.2.3 Poissons

L'utilisation du poisson *Pimephales promelas* pour évaluer la toxicité de l'argent remonte à 1972 dans une étude de Terhaar *et al.* sur la toxicité de divers produits photographiques, dont le fixateur qui est très concentré en Ag. Vingt poissons étaient exposés pendant 96 h à deux solutions types : la première contenait 57 mM de thiosulfate, 2,0 mM de sulfite et 2,3 mM d'argent alors que la deuxième en contenait respectivement 11, 0,40 et 0,46 mM. Dans le premier cas, 15 poissons ont survécu (1 décès dans le groupe contrôle) et dans le deuxième cas, aucune mortalité n'a été observée. Ces données comparées à celles obtenues sans thiosulfate (mortalité plus élevée à des concentrations d'Ag plus faibles) amenaient les auteurs à conclure que le thiosulfate diminue la toxicité de l'Ag.

Une autre étude sur ce même poisson réalisée par LeBlanc *et al.* (1984) a été utilisée par Dufficy *et al.* (1993) afin de démontrer que les effluents de l'industrie photographique « ne sont pas toxiques » et de remettre en question les critères de qualité de l'eau du

USEPA. Les travaux de LeBlanc *et al.* portaient sur la mortalité en fonction du temps selon différentes concentrations d'argent et différents ligands (chlorure, sulfure et thiosulfate). Les concentrations d'argent libre étaient mesurées par électrode sélective ou encore calculées. La mortalité était de 100 % en absence de ligand complexant pour des concentrations d'Ag de 270 et 600 nM ($[Ag_T] \approx [Ag^+]$), et de 40 % lorsque le chlorure était présent (56 mM) avec 43 μ M d'Ag ($[Ag^+] \approx 1$ nM). Les résultats avec le thiosulfate ne révélèrent que 5 à 10 % de mortalité à la concentration la plus élevée d'Ag ($[Ag_T] = 2,6$ mM et $[Ag^+] \approx 1,1$ pM). Les auteurs concluaient que la concentration totale d'un métal n'est pas représentative de son impact sur l'environnement mais qu'il faut tenir compte de sa spéciation. Il est toutefois intéressant de noter que les auteurs passent sous silence le fait qu'il y avait plus de mortalité en présence de chlorure ($[Ag_T] = 43$ μ M; $[Ag^+] \approx 1$ nM) qu'en absence de ligand ($[Ag_T] = 120$ nM; $[Ag^+] \approx 120$ nM) alors que les concentrations d'argent libre y étaient inférieures et que ces auteurs concluent que la concentration d'argent libre doit être connue afin d'évaluer l'impact de l'argent sur l'écosystème aquatique.

L'accumulation et la toxicité de l'argent chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a fait l'objet de nombreuses publications (Janes et Playle, 1995; Wood *et al.*, 1996a, b; Hogstrand *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1997; Galvez et Wood, 1997; Webb et Wood, 1998; Ferguson et Hogstrand, 1998; McGeer et Wood, 1998; Bury *et al.*, 1999a, b; Karen *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). Une de ces études nous informe sur la synthèse de métallothionéine, sur l'accumulation de l'argent dans les branchies et le foie ($t = 7$ jours) ainsi que sur les CL50 pour trois milieux contenant différents ligands (chlorure et thiosulfate; Hogstrand *et al.*, 1996). L'accumulation d'argent, particulièrement dans le foie, a été plus élevée lorsque le thiosulfate était utilisé comme ligand plutôt que le chlorure. Les auteurs mentionnent avoir tenté d'établir une relation entre $[Ag^+]$ et accumulation sans toutefois observer de corrélation. Deux autres publications sont complémentaires; la première traitant de l'influence de l'argent libre et la seconde de l'argent complexé par le thiosulfate (Wood *et al.*, 1996a, b). Dans ces expériences sur six jours, plusieurs paramètres physiologiques ont été suivis, dont les concentrations de Na, K, Cl, Ca, glucose, lactate et protéines dans le sang. Ce qui retient l'attention est la

comparaison de la concentration d'argent dans le plasma sanguin pour les deux expériences. Dans le milieu avec thiosulfate, les truites ont accumulé plus d'Ag que dans le milieu sans ligand, alors que les concentrations respectives d'Ag⁺ dans les deux milieux étaient de 30 pM et 61 nM (soit une concentration d'Ag⁺ environ 2000 fois plus élevée dans le milieu sans ligand).

Pour terminer, deux études portaient sur la crevette *Palaemonetes pugio*. Celle de Connell *et al.* (1991) a permis d'identifier les voies d'entrées de l'argent chez ce crustacé. Il a été démontré que la crevette accumule de façon constante l'argent en solution ($[Ag_T] = 19, 46$ et 93 nM) mais de façon non significative par la nourriture planctonique ou détritique. Cependant rien n'est mentionné sur la spéciation de l'argent ou sur les concentrations de chlorure du milieu. C'est pourtant ce qu'avaient fait, précédemment, Engel et Sunda (1981) avec le même organisme. En effet, ces chercheurs ont établi une meilleure relation entre l'accumulation d'argent et la concentration du complexe $AgCl^0$ en solution comparativement aux concentrations d'Ag⁺ ou d'AgCl₂⁻. Leurs expériences se résument à exposer les crevettes à différentes concentrations d'Ag et différentes salinités pendant quatre jours et à mesurer les quantités accumulées.

Les résultats d'accumulation d'Ag en présence de chlorure (Engel et Sunda, 1981; Reinfelder et Chang, 1999) et de thiosulfate (Wood *et al.*, 1996b) représentent des cas potentiels d'exceptions au modèle de l'ion libre (voir section suivante) et offrent une piste intéressante à explorer. En bout de ligne, les résultats présentés dans cette thèse aideront peut-être à tracer la voie pour mieux définir le rôle de l'ion libre dans l'expression de la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques.

1.3 Modèle de l'ion libre

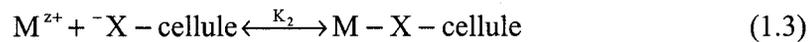
D'après le modèle de l'ion libre (MIL), la toxicité ou la bioaccumulation d'un métal varie en fonction de la concentration de l'aquo-ion (Morel, 1983). Ce modèle, tel que formulé initialement par Morel (1983), a réuni une quantité importante d'observations indiquant l'importance "universelle" de la concentration de l'ion métallique libre, M^{Z+} , dans la prédiction de la prise en charge et de la toxicité des métaux traces. Cet énoncé de Morel a

souvent été interprété à tort, en représentant l'ion libre comme l'espèce biodisponible ou toxique. En effet, l'interaction d'un métal avec une surface cellulaire peut impliquer le métal sous sa forme libre (M^{z+}), autant que sous une forme complexée (ML). Dans les deux cas, la relation entre la surface cellulaire et le métal peut être décrite en fonction de la concentration de métal libre.

Examinons d'abord la réaction de l'ion libre avec cette surface (X-cellule) :



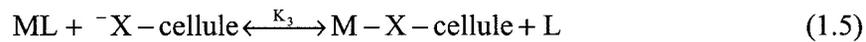
$$K_1 = \frac{[ML]}{[M^{z+}] \cdot [L]} \quad (1.2)$$



$$\{M - X - cellule\} = K_2 \cdot \{{}^{-}X - cellule\} [M^{z+}] \quad (1.4)$$

où K_1 et K_2 sont des constantes conditionnelles d'équilibre et L un ligand en solution dont la charge est omise pour simplifier les termes des équations. Ainsi, l'équation (1.4) indique que la réponse biologique, en présumant que cette réponse est proportionnelle à la concentration de métal lié à la surface $\{M-X-cellule\}$, peut être exprimée en termes de concentration de métal libre.

De façon similaire, le complexe ML peut réagir à la surface par échange de ligand :

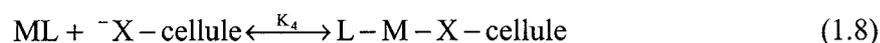


$$\{M - X - cellule\} = K_3 \cdot \frac{\{{}^{-}X - cellule\} \cdot [ML]}{[L]} \quad (1.6)$$

$$\{M - X - cellule\} = K_3 \cdot K_1 \cdot \{{}^{-}X - cellule\} [M^{z+}] \quad (1.7)$$

Ainsi, l'équation (1.7), résultat de la combinaison des équations (1.2) et (1.6), démontre la même dépendance pour la concentration de métal libre que l'équation (1.4). On ne peut donc affirmer qu'une espèce est plus disponible qu'une autre.

Ce dernier mécanisme présuppose toutefois qu'il y a échange de ligand, c'est-à-dire que le ligand "L", initialement lié au métal, ne s'y trouve plus (voir équation (1.5)). Considérons maintenant la possibilité que le ligand "L" ne soit pas échangé. Une telle réaction donnerait lieu à la formation d'un complexe ternaire L-M-X-cellule :



$$\{L-M-X\text{-cellule}\} = K_4 \cdot \{\text{X-cellule}\} \cdot [ML] \quad (1.9)$$

Dans un tel cas, la concentration de métal à la surface devient fonction de la concentration du complexe ML d'intérêt, plutôt que de $[M^{z+}]$, et il y a alors exception au MIL.

1.3.1 Hypothèses du MIL

Quatre prémisses de base sous-tendent l'applicabilité du MIL (Campbell, 1995).

- I. La membrane plasmique constitue le site primaire d'interaction des métaux en solution avec les organismes aquatiques (équation 1.3), cette interaction donnant lieu à la formation d'un complexe de surface M-X-cellule. Ceci implique que la diffusion simple (non-facilitée) du métal (ou de ces complexes) à travers la membrane plasmique est négligeable.
- II. Le transport du métal à travers la membrane plasmique est l'étape limitante. C'est-à-dire que la diffusion du métal à travers la couche non-mélangée et sa complexation subséquente à la surface biologique se produisent rapidement.
- III. La réponse biologique est proportionnelle à la concentration du complexe de surface {M-X-cellule}. De plus, la concentration des sites de liaisons libres {X-cellule}, doit demeurer à-peu-près constante à l'intérieur de la gamme de concentrations métalliques d'intérêt toxicologique.
- IV. Lors de l'exposition au métal d'intérêt, la surface biologique ne doit pas changer.

Les exceptions au MIL découlent habituellement d'une prémisses non respectée. Les exceptions de type I impliquent la formation de complexes lipophiles (avec le diéthyl-dithiocarbamate par exemple; Phinney et Bruland, 1994) pouvant diffuser de façon passive à l'intérieur de l'organisme. Les exceptions de type II peuvent impliquer soit des métaux possédant une cinétique de complexation lente (Fe(III), Cr(III), Al, Ni) ou encore un transport à travers la couche diffuse plus lent que la prise en charge. Le premier cas a été démontré par Hudson et Morel (1990) pour le Fe où les échanges de surface étaient plus lents que le transport transmembranaire du Fe. Le deuxième cas a été évoqué par Gutknecht (1981) suite à la très grande perméabilité de membranes bilipidiques pour l'espèce neutre $HgCl_2^0$ dans la gamme de concentrations de Cl⁻ : 0 – 100 mM. Les

exceptions de type III impliquent la formation d'un complexe ternaire {L-M-X-cellule} contribuant à la réponse biologique (Wilkinson *et al.*, 1990) ou encore d'un complexe ternaire réagissant avec un site de transport d'anions Y {M-L-Y-cellule}, contribuant aussi à l'entrée du métal (Errécalde *et al.*, 1998; Errécalde et Campbell, 2000).

D'autres facteurs peuvent moduler la réponse biologique d'un organisme exposée à un métal. Par exemple, les cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}) ainsi que l'ion H^+ peuvent entrer en compétition avec le métal pour les sites de complexation de sorte que certains résultats non conformes au MIL peuvent provenir d'une modification des concentrations de ces ions lors de l'exposition au métal d'intérêt. Finalement, le MIL ne tient pas compte de l'adaptation de l'organisme cible, de l'acquisition de tolérance. Il s'ensuit que le modèle s'applique mieux dans le cas d'expositions aiguës qu'à des expositions chroniques à long terme.

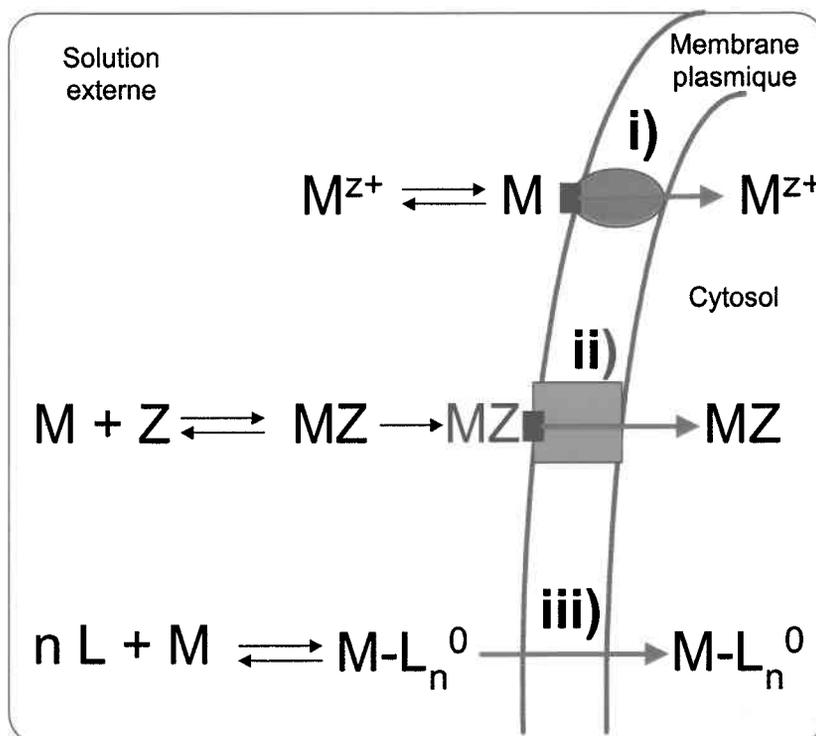


Figure 1.1 : Représentation conceptuelle du transport transmembranaire d'un métal non-essentiel : i) par un site de transport spécifique pour les métaux essentiels (ex.: Cu; Zn; Ca); ii) par un site de transport facilité de métabolites (ex.: Z = acide aminé) ou d'anions (ex.: Z = Cl^- , CO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$); iii) par diffusion passive de formes neutres.

1.3.2 Concept de transport accidentel ou facilité

La spéciation des métaux, et donc leur biodisponibilité, est contrôlée par la présence de ligands (inorganiques et organiques) en solution, qui peuvent former des complexes neutres ou de charges négatives ou positives. Par exemple, pour entrer en contact avec la surface cellulaire d'une algue, les métaux doivent traverser la couche diffuse et la paroi cellulaire pour atteindre la membrane plasmique. Les différentes espèces chimiques d'un métal peuvent alors entrer dans la cellule selon différents mécanismes de transport qui sont proposés à la figure 1.1 : i) par un site de transport spécifique pour les métaux essentiels (ex.: Cu; Zn; Ca); ii) par un site de transport facilité de métabolites (ex.: acide aminé) ou d'anions (ex.: $Z = Cl^-$, CO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$); iii) par diffusion passive. Notons que le premier mécanisme est celui qui sous-tend le modèle de l'ion libre; par ailleurs, si les mécanismes (ii) ou (iii) intervenaient, ils mèneraient à des exceptions au MIL.

Le mécanisme (ii) a été récemment évoqué pour expliquer des résultats déviants du MIL lors d'expositions d'algues unicellulaires au Cd en présence du citrate, un métabolite de poids moléculaire faible (Errécalde *et al.*, 1998; Errécalde et Campbell, 2000). Quelques autres exemples documentés abondent en ce sens (Campbell, 1995). Quant au mécanisme (iii), la diffusion passive, il s'applique aux cas de ligands formant des complexes hydrophobes. Par exemple, le mercure peut former des complexes lipophiles avec le chlorure ($HgCl_2^0$, CH_3HgCl^0 ; Mason *et al.*, 1996) mais il existe également plusieurs exemples de ligands organiques, tels que le diéthyl-dithiocarbamate et l'oxine (Phinney et Bruland, 1994) ou encore les xanthates (Block et Wicklund Glynn, 1992), formant des complexes lipophiles avec les métaux (ex. : Cd, Zn). Ces ligands organiques d'origine anthropique sont cependant rarement détectés en milieu naturel, et donc la pertinence environnementale de ce mécanisme reste à être démontrée.

Dans la présente recherche, nous allons mettre l'accent sur des ligands inorganiques. Ceux-ci sont omniprésents dans les eaux naturelles, peuvent avoir un impact important sur la spéciation de plusieurs métaux dont l'Ag et, potentiellement, peuvent mener à des

exceptions au MIL. Six études ont été identifiées où le MIL ne pouvait expliquer les observations d'accumulation de métaux en présence de ligands inorganiques :

- i) la toxicité de l'Al en présence de fluorures s'est avérée plus élevée que prévue chez des tacons de saumon Atlantique, indiquant la présence d'un complexe mixte du type F-Al-X-cellule à la surface des branchies (Wilkinson *et al.*, 1990);
- ii) la bioaccumulation du Cd chez *Beta vulgaris* s'est avérée plus élevée en présence de chlorure qu'en absence de cet anion, même si la concentration en Cd²⁺ libre a été maintenue constante (Smolders et McLaughlin, 1996a, b);
- iii) des résultats similaires avec le chlorure ont été récemment rapportés chez la bactérie *E. coli* où l'augmentation de la concentration en chlorure de 2,8 µM à 28 mM n'a pas diminué la toxicité du Cd (Cd²⁺ : 100 % → 40 %) et du Pb (Pb²⁺ : 90 % → 60 %), contrairement à ce qu'aurait prédit le MIL (Sarin *et al.*, 2000);
- iv) la prise en charge de l'Ag par des crevettes en milieu estuarien suit mieux la concentration en AgCl⁰ que celle en Ag⁺ (Engel *et al.*, 1981);
- v) Wood *et al.* (1996b) ont mesuré des concentrations d'Ag dans le plasma sanguin de truites arc-en-ciel plus grandes que ne l'aurait prédit le MIL pour des milieux contenant une forte quantité de thiosulfate (rapport [Ag] : [S₂O₃²⁻] de 1 : 4);
- vi) Reinfelder et Chang (1999) ont observé un taux d'accumulation d'Ag plus élevé chez une diatomée lorsque la concentration de l'espèce AgCl⁰ est à son apogée.

Dans presque tous les cas, les mécanismes impliqués n'ont cependant pas été clairement identifiés.

1.4 Choix de l'organisme

Des algues unicellulaires ont été choisies comme cible biologique pour plusieurs raisons : la possibilité d'utiliser une grande population, un taux de croissance rapide, un rapport {surface : volume} élevé et un milieu de culture inorganique simple qui permet de bien contrôler la spéciation des métaux ajoutés à ce milieu.

L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae* : algue verte) a été sélectionnée pour trois raisons : i) cette espèce a déjà fait l'objet de plusieurs études, non seulement d'ordre toxicologique mais est également de nature génétique; c'est probablement l'espèce algale la mieux caractérisée génétiquement¹ (Davies et Plaskitt, 1971; Harris, 1989); ii) une souche mutante de *C. reinhardtii* ne possédant pas de paroi cellulaire est disponible (Hyams et Davies, 1972), ce qui pourrait être utile pour évaluer l'impact de la paroi sur la prise en charge des métaux; et finalement iii) cette espèce est halotolérante, qualité essentielle pour déterminer l'influence du chlorure sur la prise en charge de l'Ag.

Les souches autochtone et mutante (sans paroi) de cette algue verte ont fait l'objet de quelques études sur l'influence des métaux traces autres que l'Ag (Cain et Allen, 1980; Tarmohamed, 1990; Macfie *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1998). Dans ces travaux, on a suivi la croissance des algues en employant le rendement comme réponse biologique; ces travaux ne permettaient cependant pas d'identifier des mécanismes de prise en charge des métaux. Toutefois, l'utilisation des souches avec et sans paroi peut s'avérer un « outil » très intéressant pour déterminer le rôle de la paroi cellulaire dans le flux des métaux.

1.5 Objectifs

Cette recherche avait comme objectif principal de déterminer si la prise en charge de l'argent en présence de ligands inorganiques simples (chlorure et thiosulfate) suit les prédictions du modèle de l'ion libre. Dans un second temps, ayant effectivement mis en évidence des déviations majeures au MIL, on cherchait à déterminer les causes de ces déviations, soit par une cinétique d'échange à la surface limitante, soit par un transport limitant vers la surface à travers la couche diffuse, ou encore par la présence d'une voie d'entrée supplémentaire pour l'Ag. Trois voies d'entrée possibles de l'argent lorsqu'en présence de certains anions ont été identifiées : i) transport de l'Ag via un transporteur de cations; ii) transport du complexe Ag-ligand par perméase de ligand; iii) transport de la forme neutre, AgCl^0 , par diffusion passive à travers la bicouche lipidique. Les hypothèses

¹ L'adresse internet <http://www.botany.duke.edu/chlamy/> mène au *Chlamydomonas Genetics Center*, au *Chlamydomonas database* et au *Chlamydomonas Genome Project* et autres ressources concernant cette espèce.

de départ étaient que la prise en charge de l'argent « stimulée » par la présence de thiosulfate et de chlorure s'expliquerait respectivement par les scénarios ii) et iii).

2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

2.1 Algues

Des cultures axéniques de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ont été obtenues de l'Université de Toronto (Judy Acreman, *University of Toronto Culture Collection*). Deux souches, avec et sans paroi cellulaire (UTCC11 : *C. reinhardtii* WT et UTCC12 : *C. reinhardtii* WL), ont été utilisées.

Les cellules étaient cultivées de façon axénique en lots de 100 mL dans des erlenmeyers en polycarbonate de 250 mL sous une luminosité ($100 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et température (20°C) constantes. Afin de conserver les cellules en suspension, les flacons de culture étaient placés sur une table agitatrice (~ 50 rpm). L'entretien régulier des cultures permettait de conserver les cellules dans un bon état physiologique. Ainsi, de façon hebdomadaire, un milieu frais et stérile ($\text{pH} = 7$) était inoculé de ~ 2 mL d'une culture d'algue de la semaine précédente. L'absence de contamination par des bactéries a été vérifiée périodiquement par placage sur agar (*Difco-Bacto agar*).

2.2 Choix des milieux de culture et d'exposition

Le milieu de culture HSM utilisé par Macfie *et al.* (1994) pour ces mêmes algues a été modifié afin de diminuer les concentrations de phosphate et d'ammonium. Toutefois, ces modifications n'ont altéré ni le rendement, ni le taux de croissance des algues, qui étaient comparables à ceux obtenus avec le milieu HSM original (figure 2.1). Le premier milieu, baptisé MHSM-1, contient une très faible quantité de chlorure ($6 \mu\text{M}$, voir tableau 2.1) et était destiné aux expériences effectuées avec l'argent, dont la spéciation est sensible à cet anion. Le second milieu, MHSM-2, est similaire au premier à l'exception de la force ionique qui y est plus élevée ($100 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$ par rapport à $6 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$ pour MHSM-1, voir tableau 2.2) grâce à l'ajout d'une grande quantité de KNO_3 et de KCl . Ce dernier milieu a permis d'élargir la gamme de concentrations de chlorure lors d'expositions des cellules à l'Ag. Des expériences préliminaires ont démontré que le rendement de l'algue était ~ 4

fois inférieur à une concentration en chlorure de 125 mM comparativement à 100 mM (figure 2.2).

Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et anions composant le milieu de culture MHSM-1

| Ions | HSM ¹ | MHSM-1 culture | MHSM-1 rinçage | MHSM-1 exposition |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| NH ₄ | 9,35 x 10 ⁻³ | 9,37 x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁴ |
| Cl | 9,49 x 10 ⁻³ | 5,98 x 10 ⁻⁶ | - | variable |
| K | 2,20 x 10 ⁻² | 4,22 x 10 ⁻³ | 4,22 x 10 ⁻³ | 4,22 x 10 ⁻³ |
| PO ₄ | 1,37 x 10 ⁻² | 1,37 x 10 ⁻⁴ | - | - |
| CO ₃ | atm. ² | atm. ² | atm. ² | atm. ² |
| NO ₃ | - | 5,07 x 10 ⁻³ | 5,07 x 10 ⁻³ | variable |
| SO ₄ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Mg | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Ca | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ |
| Na | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ |
| BO ₃ | 3,01 x 10 ⁻⁶ | 3,01 x 10 ⁻⁶ | - | - |
| Mn | 2,10 x 10 ⁻⁶ | 2,10 x 10 ⁻⁶ | - | - |
| EDTA | 8,06 x 10 ⁻⁷ | 8,06 x 10 ⁻⁷ | - | - |
| Fe | 5,92 x 10 ⁻⁷ | 5,92 x 10 ⁻⁷ | - | - |
| MoO ₄ | 3,00 x 10 ⁻⁸ | 3,00 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Zn | 2,43 x 10 ⁻⁸ | 2,43 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Co | 1,09 x 10 ⁻⁸ | 1,09 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Cu | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | - | - |

1 Macfie *et al.* (1994).

2 Aucun ajout de carbonates, la concentration de ces derniers s'ajustant par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

La croissance de *C. reinhardtii* est caractérisée par une phase latente courte (12 – 24 h) suivie d'une croissance exponentielle rapide ($\mu \approx 2 \text{ div.} \cdot \text{j}^{-1}$) également courte (24 – 36 h). Ensuite, après 3 à 4 jours, les cellules atteignent une phase stationnaire au cours de laquelle le pH baisse (~ 4). Cet excès d'acidité est probablement causé par l'assimilation de l'azote sous forme d'ammonium (cette espèce préférant fortement cette forme aux nitrates) qui se fait par un échangeur $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{H}^+$ (Raven 1976) et possiblement par l'épuisement de la capacité tampon du milieu à la suite de l'assimilation du phosphate. Dès lors que la densité cellulaire devient importante, la production d'ions H^+ devient

suffisamment importante pour excéder la capacité tampon du milieu et le pH baisse. Cette baisse ne s'observe toutefois que bien après la fin de la phase exponentielle.

Tableau 2.2 : Concentrations molaires des cations et anions composant le milieu de culture MHSM-2

| Ions | HSM ¹ | MHSM-2 culture | MHSM-2 rinçage | MHSM-2 exposition |
|------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| NH ₄ | 9,35 x 10 ⁻³ | 9,37x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁴ |
| Cl | 9,49 x 10 ⁻³ | 5,00 x 10⁻² | - | Variable |
| K | 2,20 x 10 ⁻² | 1,00 x 10⁻¹ | 1,00 x 10 ⁻¹ | 1,00 x 10 ⁻¹ |
| PO ₄ | 1,37 x 10 ⁻² | 1,37 x 10 ⁻⁴ | - | - |
| CO ₃ | atm. ² | atm. ² | atm. ² | atm. ² |
| NO ₃ | - | 5,01 x 10⁻² | 1,00 x 10 ⁻¹ | variable |
| SO ₄ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Mg | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Ca | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ |
| Na | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ | 1,02 x 10 ⁻⁴ |
| BO ₃ | 3,01 x 10 ⁻⁶ | 3,01 x 10 ⁻⁶ | - | - |
| Mn | 2,10 x 10 ⁻⁶ | 2,10 x 10 ⁻⁶ | - | - |
| EDTA | 8,06 x 10 ⁻⁷ | 8,06 x 10 ⁻⁷ | - | - |
| Fe | 5,92 x 10 ⁻⁷ | 5,92 x 10 ⁻⁷ | - | - |
| MoO ₄ | 3,00 x 10 ⁻⁸ | 3,00 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Zn | 2,43 x 10 ⁻⁸ | 2,43 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Co | 1,09 x 10 ⁻⁸ | 1,09 x 10 ⁻⁸ | - | - |
| Cu | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | - | - |

1 Macfie *et al.* (1994).

2 Aucun ajout de carbonates, la concentration de ces derniers s'ajustant par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

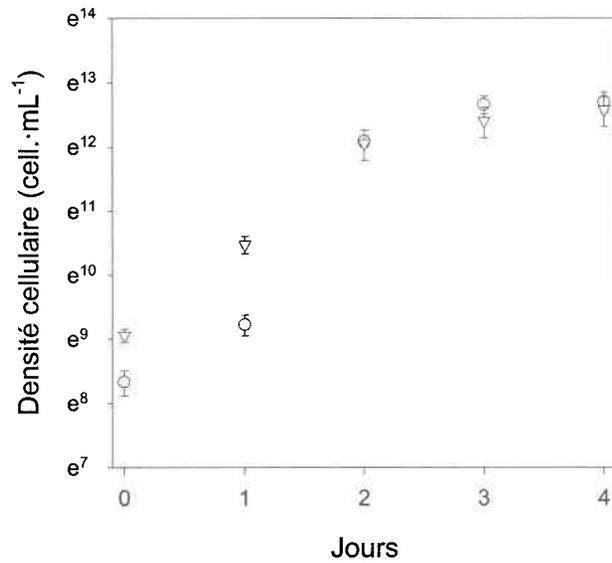


Figure 2.1 : Comparaison de la croissance de *C. reinhardtii* (souche autochtone) en milieu HSM (∇) et en milieu MHSM-1 (\circ). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de dix mesures.

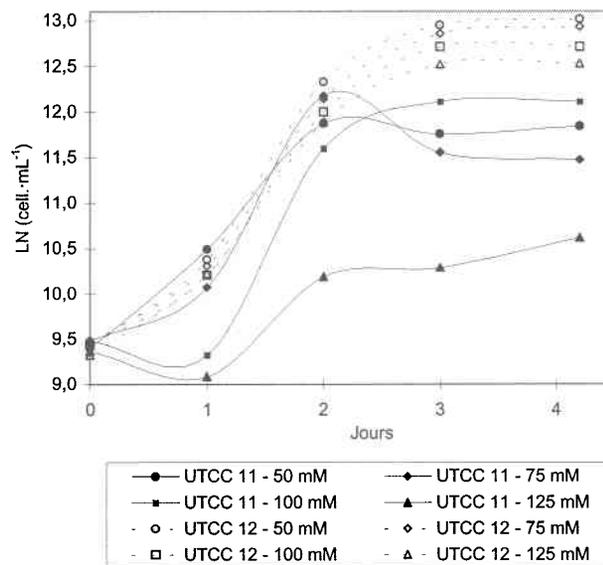


Figure 2.2 : Croissance de la population des souches mutante (UTCC 12) et autochtone (UTCC 11) de *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque cultivées dans un milieu contenant 50, 75, 100 ou 125 mM KCl.

2.2.1 Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture étaient préparés à partir de six solutions stock conservées dans l'obscurité à 4°C. Ces solutions sont décrites au tableau 2.3. Toutes ces solutions étaient filtrées (0,20 µm; Poretics) afin d'enlever les particules abiotiques, qui pourraient causer un biais lors du comptage des algues ou encore adsorber les métaux en solution, et les bactéries pouvant modifier la composition de ces solutions stock. Les oligo-éléments (mélange AAP, voir tableau 2.3) n'étaient ajoutés que 24 heures après avoir stérilisé par autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes le milieu de base reconstitué, afin d'éviter la précipitation de composés peu solubles à température élevée (Price *et al.*, 1989). Le pH était ensuite ajusté à $7,0 \pm 0,2$ à l'aide d'une solution de NaOH 0,10 M (Aristar, BDH).

Tableau 2.3 : Compositions et proportions des solutions stock servant à la préparation des milieux de culture MHSM-1 et MHSM-2

| Milieu MHSM-1 | Volume | Solution (filtrée 0,2 µm) | Cristaux | Quantité | Fournisseur | | | |
|--------------------------|------------------------|---------------------------|--|-------------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------|-------|
| Ammonium #2 | 5 mL•L ⁻¹ | Phosphates #2 | KH ₂ PO ₄ | 29,6 g•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| Phosphates #2 | 250 µL•L ⁻¹ | | K ₂ HPO ₄ | 57,6 g•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| KNO ₃ (1,0 M) | 4 mL•L ⁻¹ | Ammonium #2 | NH ₄ NO ₃ | 15,0 g•L ⁻¹ | Omega | | | |
| AAP* | 1 mL•L ⁻¹ | | | | | MgSO ₄ •7H ₂ O | 4,00 g•L ⁻¹ | Omega |
| NaOH (0,10 M)* | 1 mL•L ⁻¹ | | | | | | | |
| Milieu MHSM-2 | | AAP | H ₃ BO ₃ | 186 mg•L ⁻¹ | ACP | | | |
| Ammonium #2 | 5 mL•L ⁻¹ | | MnCl ₂ •4H ₂ O | 415 mg•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| Phosphates #2 | 250 µL•L ⁻¹ | | FeCl ₃ •6H ₂ O | 160 mg•L ⁻¹ | BDH | | | |
| KCl (1,0 M) | 50 mL•L ⁻¹ | | Na ₂ EDTA•2H ₂ O | 300 mg•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| KNO ₃ (1,0 M) | 49 mL•L ⁻¹ | | Zn (1 g•L ⁻¹) | 1,59 mg•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| AAP* | 1 mL•L ⁻¹ | | Co (1 g•L ⁻¹) | 0,64 mg•L ⁻¹ | Fisher | | | |
| NaOH (0,10 M)* | 1 mL•L ⁻¹ | Mo (1 g•L ⁻¹) | 2,88 mg•L ⁻¹ | Fisher | | | | |
| | | Cu (1 g•L ⁻¹) | 4,47 µg•L ⁻¹ | Fisher | | | | |

*24 heures après autoclavage

2.3 Équipements et produits

L'utilisation de contenants en Téflon® (TFE, PTF), réputé pour sa faible capacité d'adsorption, a été privilégiée. Les solutions stock d'argent acidifiées étaient conservées au réfrigérateur dans des bouteilles de Téflon® opaque, évitant ainsi la possibilité de photo-réduction de l'Ag(I). Tous les contenants, unités de filtration (polysulfone, Nalgene) et pointes de pipettes étaient préalablement trempés dans un bain d'acide nitrique (10 – 15 %) pendant au moins 24 heures, ensuite soigneusement rincés avec de l'eau ultrapure (~ 18 Mohms•cm) pour être finalement séchés sous une hotte à flux laminaire. Les manipulations axéniques des cultures d'algues se faisaient sous la hotte à flux laminaire en utilisant des solutions et de l'équipement stérilisés par autoclave, à l'éthanol ou par filtration à 0,2 µm. Les cristaux de sels utilisés pour les cultures et les expériences étaient de grade analytique ou ultrapur. Les radio-isotopes de l'argent (^{110m}Ag , 1,26 mCi•mg⁻¹) et du manganèse (^{54}Mn , 24,8 mCi•mg⁻¹) provenaient de Amersham Canada, alors que celui du chlorure (^{36}Cl , 13,3 µCi•mg⁻¹) provenait de NEN *Life Science Products*.

2.4 Dosage des radio-éléments

L'activité des isotopes d'Ag et de Cl était mesurée à l'aide d'un compteur bêta (Wallac 1414) et d'un liquide à scintillation (Eco-Lume, ICN). Une courbe d'efficacité a été obtenue en fonction de la présence ou de l'absence de filtre et / ou d'algues (les compteurs bêta étant sensibles aux effets de matrice). Aucun étalon commercial n'étant disponible pour ces isotopes, l'efficacité était déterminée en répétant plusieurs dilutions ($N \geq 6$) à partir de la source originale. D'ailleurs, ^{110m}Ag peut être dosé par compteur gamma ou bêta mais ce dernier possède une meilleure efficacité (90 %) que le compteur gamma (44 %); toutefois, le ratio eau : solvant (1 : 5) choisi s'est révélé être instable, les deux liquides se séparant en bi-phase. Les échantillons aqueux d' ^{110m}Ag étaient donc analysés par compteur gamma (Wallac 1480) alors que les algues marquées et récoltées sur filtre étaient analysées par compteur bêta afin de profiter de la meilleure sensibilité de cet appareil. Dans le cas du ^{54}Mn , seul le compteur gamma était utilisé (efficacité de 31 %). Les solutions stock de ces solutions étaient conservées dans l'obscurité à 4°C.

Le temps de comptage était habituellement de 20 min, ce qui permettait d'obtenir une erreur inférieure à 1 % sur l'activité totale du radio-isotope. Dans le cas où l'activité était plus faible, le temps de comptage était augmenté afin de limiter l'erreur à moins de 4 %. La fenêtre entière a été utilisée pour mesurer la désintégration dans le spectre bêta, soit de 1 à 1024 keV (^{36}Cl ; $^{110\text{m}}\text{Ag}$). Dans le spectre gamma, la fenêtre choisie pour l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ allait de 329 à 987 keV (pic principal à 658 et pic secondaire à 885 keV) alors que celle utilisée pour le ^{54}Mn était comprise entre 420 et 1000 keV (pic à 835 keV).

La conversion de comptes par minute (CPM) en désintégrations par minute (DPM) pouvait être fait en divisant les CPM par l'efficacité (%) du détecteur pour le radio-isotope d'intérêt. Dans le cas du compteur bêta, cette conversion était fait par le logiciel d'exploitation. Une fois les DPM obtenues, ces derniers étaient transformées en nCi ($2220 \text{ DPM} \cdot \text{nCi}^{-1}$) pour être ensuite corrigées pour les pertes par désintégration selon l'équation 2.1 :

$$N = N_0 \cdot e^{-\frac{\ln 2 \cdot t}{t^{1/2}}} \quad (2.1)$$

où N est l'activité à un temps t, N_0 est l'activité initiale et $t^{1/2}$ est la demi-vie du radio-isotope (^{36}Cl : 30 800 ans; $^{110\text{m}}\text{Ag}$: 249,8 jours; ^{54}Mn : 312 jours). Puis, la quantité de l'élément (μmol ou nmol) présent sur le filtre était calculée à l'aide de l'activité spécifique tel qu'étalonné par le fournisseur de l'isotope. Finalement, la quantité était normalisée pour la surface totale d'algue (m^2 ; 1 cellule $\approx 50 \mu\text{m}^2$).

2.5 Méthodologie de récolte et d'exposition des cellules

La méthodologie utilisée pour récolter les algues s'inspirait largement de celle décrite dans des publications antérieures provenant de notre laboratoire (Bates *et al.*, 1982, 1983; Harrison *et al.*, 1986; Schenck *et al.*, 1988). Toutefois, l'utilisation de la centrifugation comme méthode de récolte a été remplacée par la filtration afin d'éviter la formation d'un culot dans lequel des conditions anoxiques pourraient s'installer.

L'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* possède un diamètre moyen oscillant entre 4 et 5 μm . La récolte des cellules avant et après l'exposition se faisait à l'aide de filtres en polycarbonate d'une porosité de 2 μm (Poretics). Ces filtres ne nécessitent qu'une très faible pression pour récupérer les algues. Afin de ne pas abîmer les cellules, particulièrement celles ne possédant pas de paroi cellulaire, un vide maximal de 10 cm Hg a été utilisé. Toutefois, puisque la viabilité des cellules sans paroi après l'étape de filtration n'a pas pu être démontré, seule la souche autochtone a été utilisée pour les expériences de prise en charge.

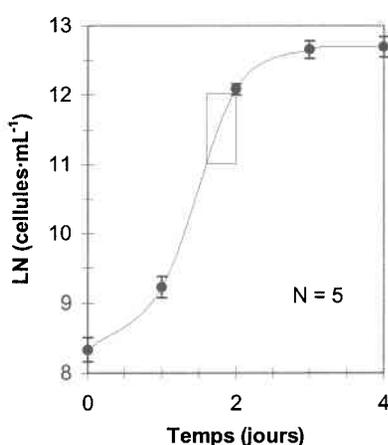


Figure 2.3 : Courbe de croissance typique de *C. reinhardtii*. Encadré : fenêtre expérimentale. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures.

Bates *et al.* (1983) avaient démontré que l'état physiologique des algues affectait grandement les niveaux d'accumulation des métaux. Il a donc été convenu que les algues seraient toujours récoltées en phase exponentielle. La fenêtre expérimentale, illustrée à la figure 2.3, était comprise entre les densités algales de 60 000 et 180 000 $\text{cell.}\cdot\text{mL}^{-1}$. Lorsque la population d'algues atteignait cette concentration (~ 48 heures après une inoculation à une densité initiale de 2 500 $\text{cell.}\cdot\text{mL}^{-1}$), les algues étaient récoltées sur un filtre de 2,0 μm et rincées cinq fois, à raison de 10 mL à chaque rinçage, avec une solution de culture simplifiée, ne contenant ni métaux, ni phosphates (voir tableaux 2.1 et 2.2). Ce rinçage permettait d'éliminer la présence de ligands (EDTA, chlorure, exsudat d'algue) pouvant perturber la spéciation de l'Ag dans les milieux d'exposition, et la

présence de métaux (Fe, Cu, Mn, Zn) pouvant potentiellement entrer en compétition avec l'argent pour les sites de complexation à la surface des cellules. Les algues étaient alors resuspendues dans un faible volume (~ 10 mL) de cette même solution. Le nombre de cellules et leur superficie étaient ensuite déterminés à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Multisizer II, dilution de 1 mL dans 9 mL de solution isotonique, Isoton II) avec un tube possédant une ouverture de 70 µm. Les algues étaient alors rapidement distribuées dans les flacons d'exposition, à une densité algale de 10 000 cell. • mL⁻¹. Cette densité permettait d'obtenir un signal suffisamment élevé sur les détecteurs de radiation tout en minimisant (< 8 %) la diminution de la concentration du métal en solution pour une exposition de courte durée (< 60 min); ainsi, les conditions d'exposition étaient sensiblement constantes au cours de l'expérience. Les temps d'exposition courts avaient également l'avantage d'éviter une modification significative du nombre de cellules par division cellulaire (< 5 % après 1 h) ou encore une production par l'algue d'exsudat pouvant modifier la spéciation du métal lors de l'exposition. Les cellules étaient alors exposées à l'argent dans les conditions décrites pour chaque expérience. À moins d'indications contraires, les expositions ont été réalisées à la température ambiante (22°C), sous un faible régime lumineux de ~ 7 µmol • m⁻² • s⁻¹, avec un minimum de trois répétitions et à un pH de 7,0 ± 0,1. Aucun ajout de tampon à pH n'a été effectué car les effets de ces composés sur la spéciation des métaux et les propriétés de surface des cellules demeurent inconnus (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Une fois le temps de l'exposition écoulé, les algues (50 mL X 10 000 cell. • mL⁻¹ = 500 000 cellules) étaient récupérées sur deux filtres superposés de 2 µm (polycarbonate, Poretics). Le deuxième filtre permettait d'évaluer le bruit de fond causé par l'adsorption et / ou l'absorption des métaux sur le filtre. La différence de radioactivité entre le premier et le deuxième filtre était donc identifiée au radio-métal pris en charge par les cellules, en prenant soin de désorber préalablement le métal faiblement lié à la surface des algues (voir ci-après). Les résultats d'accumulation étaient par la suite normalisés en fonction de la surface totale des algues. Cette normalisation facilite la comparaison des taux de prise en charge entre espèces de tailles ou poids différents et permet une conversion rapide des taux de prise en charge (µmol • m⁻²) en flux (µmol • m⁻² • min⁻¹).

2.6 Récupération de l'Ag après filtration

Une première série d'expériences en absence d'algues a été réalisée afin de s'assurer que l'activité résiduelle des deux filtres superposés (2,0 μm , Poretics) soit assez faible. D'abord, cinq solutions de 50 mL contenant 10 nM d'Ag à pH 7 ont été filtrées, et les filtres dosés tels quels, sans aucun rinçage. La radioactivité détectée sur le premier filtre indiquait une concentration moyenne de $10,6 \pm 0,7$ pmol Ag alors que pour le deuxième filtre, cette concentration était de $2,0 \pm 0,2$ pmol Ag. Cette différence a été interprétée comme étant due à la présence d'Ag adsorbé à des particules en suspension. Pour vérifier cette hypothèse, la même expérience a été répétée en filtrant à 0,2 μm avant la filtration à 2 μm . Les concentrations d'Ag mesurées sur les premier et deuxième filtres étaient respectivement de $0,4 \pm 0,1$ et de $0,8 \pm 0,3$ pmol. La filtration à 0,2 μm a donc permis d'abaisser à un niveau acceptable l'activité résiduelle de $^{110\text{m}}\text{Ag}$. Ainsi, toutes les expériences subséquentes ont été précédées d'une filtration à 0,2 μm . Également, l'activité de ce pré-filtre était mesurée à chaque fois afin de s'assurer que la concentration d'Ag en solution n'était pas affectée significativement par l'adsorption sur les particules.

2.7 Distinction entre métal adsorbé et métal intracellulaire

La distinction entre le métal adsorbé à la surface de la cellule algale et le métal intracellulaire s'avère indispensable si l'on veut bien interpréter les résultats d'exposition. L'adsorption des métaux à la surface des algues est caractérisée par une augmentation très rapide dans les premières minutes suivie d'un plateau survenant lorsque tous les sites sont saturés (Bates *et al.*, 1982; Schenck *et al.*, 1988; Knauer *et al.*, 1997a). Quant au métal entrant à l'intérieur de la cellule, le métal intracellulaire, il augmente de façon linéaire dans le temps jusqu'à ce que le taux d'entrée diminue ou encore que le taux de sortie augmente. Ainsi, une mauvaise distinction entre l'adsorption et l'absorption peut entraîner une sur-estimation de la prise en charge d'un métal, surtout lors d'expériences sur de courtes périodes d'exposition.

Dans le cas de métaux bivalents comme le Cd, le Zn, le Cu et le Mn, cette différenciation entre $[M]_{\text{ads.}}$ et $[M]_{\text{cell.}}$ se fait facilement par une extraction à l'EDTA (10^{-3} à 10^{-5} M; Bates *et al.*, 1982; Harrison *et al.*, 1986; Schenck *et al.*, 1988; Knauer *et al.*, 1997a, b). Cependant, ce ligand est beaucoup moins efficace pour désorber l'Ag. En effet, l'affinité de l'EDTA pour l'Ag ($\log K_{\text{AgEDTA}} = 8,10$) étant plus faible que celle pour le Ca ($\log K_{\text{CaEDTA}} = 12,41$) et le Mg ($\log K_{\text{MgEDTA}} = 10,41$), l'Ag ne sera significativement lié à l'EDTA que lorsque la concentration de ce dernier atteindra les mM (i.e. lorsque $[\text{EDTA}] > [\text{Ca}], [\text{Mg}]$). À de telles concentrations, la spéciation du Ca et du Mg est grandement affectée, ce qui n'est pas souhaitable (i.e., une baisse de l'activité du Ca^{2+} et du Mg^{2+} pourrait modifier les propriétés de surface des cellules).

Il existe peu d'alternatives à l'EDTA afin de distinguer entre le métal adsorbé et le métal intracellulaire. Un bon ligand de désorption doit avoir une grande affinité pour le métal d'intérêt et, essentiellement, doit être non métabolisable. Le chlorure ou le thiosulfate complexent efficacement l'argent, mais sont tous deux métabolisables. De plus, comme cette thèse porte sur l'effet de ces anions sur la prise en charge de l'Ag et qu'au moment d'établir le protocole expérimental la contribution possible de ces ligands à la prise en charge de l'argent n'était pas encore connue, il a été jugé préférable de ne pas les utiliser (de plus, le thiosulfate est métabolisable). La possibilité d'utiliser le sulfoxine (8-hydroxyquinoline-5-sulfonate) a d'abord été considérée mais son affinité pour l'Ag était insuffisante (voir annexe A).

Une autre façon de différencier le métal adsorbé du métal intracellulaire est par échange isotopique. Il suffit de rincer les algues au terme d'une exposition à l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ avec une quantité élevée d'Ag stable; ce dernier n'étant pas mesuré au compteur de radiation, seul le radio-isotope est détecté. Cette méthode a été utilisée par Smolders et McLaughlin (1996a, b) pour distinguer le $[\text{Cd}]_{\text{cell.}}$ du $[\text{Cd}]_{\text{ads.}}$, en immergeant les racines des plantes exposées au ^{109}Cd dans une solution contenant 10 μM de Cd stable et 10 mM de CaCl_2 . Afin de tester cette possibilité, quelques expériences ont été réalisées.

2.8 Efficacité de désorption de ^{110m}Ag lors du rinçage post-exposition

Les paramètres pouvant influencer l'efficacité de rinçage sont : le volume de solution de rinçage, le nombre de rinçages, le temps de contact avec les algues et la concentration d'argent non radioactif.

Dans un premier temps, lors d'une expérience type ($\text{pH} = 7,0$; $[\text{Ag}] = 10 \text{ nM}$; $t = 10 \text{ min}$; $N = 3$), l'activité de ^{110m}Ag a été suivie dans le filtrat à la suite de chaque rinçage de 10 mL d'Ag 10 nM, pour un total de 10 rinçages. Les résultats obtenus et illustrés à la figure 2.4 (pour les cinq premiers rinçages) indiquent qu'après deux rinçages, l'activité moyenne de ^{110m}Ag dans le filtrat est inférieure à deux fois la valeur du bruit de fond (12 DPM). Deux rinçages, d'une durée moyenne de trois minutes chacun, suffisent donc pour enlever l'Ag faiblement lié à la surface des algues. L'accumulation d'Ag intracellulaire ($[\text{Ag}]_{\text{cell.}}$) était de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ pour cette expérience.

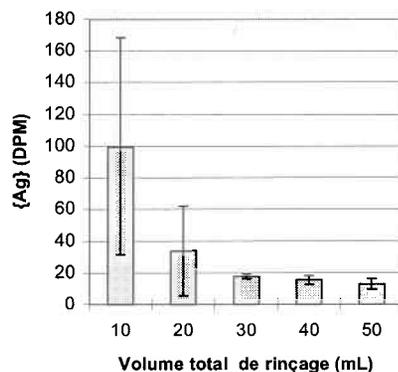


Figure 2.4 : Activité de l'Ag dans le filtrat en fonction du volume total de rinçage lors d'une exposition de 10 min à 10 nM Ag^+ . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Afin de déterminer la concentration nécessaire pour désorber ^{110m}Ag lors de l'étape du rinçage, différentes concentrations d'Ag stable ont été comparées. D'abord, l'activité lorsqu'aucun rinçage n'était effectué a été déterminée. Ensuite, pour fin de comparaison avec les résultats obtenus dans l'expérience précédente lorsque la concentration d'Ag de la solution de rinçage avait été de 10 nM, des concentrations de 100 et 1000 nM dans la solution de rinçage (2 X 10 mL) ont été utilisées dans des conditions d'exposition

identiques. Les concentrations d'argent dites intracellulaires ($[Ag]_{cell.}$) sont compilées au tableau 2.4.

Selon ces résultats, il n'y a pas de différence significative (test de Student; $P < 0,05$) entre les rinçages de 100 et 1000 nM. Ceci suggère qu'une concentration de 100 nM d'isotope d'Ag stable suffit pour désorber l' ^{110m}Ag faiblement lié à la surface des algues. De plus, on peut déduire après une exposition de 10 min, que la portion de l' ^{110m}Ag qui est adsorbé sur la paroi et la membrane plasmique représente environ 50 % de l'accumulation totale.

Tableau 2.4 : Concentrations d'Ag pris en charge ($\mu mol \cdot m^{-2}$) par *C. reinhardtii* (WT) après 10 min d'exposition selon la concentration d'Ag non radioactif présent dans la solution de rinçage.

| Aucun | 10 nM [†] | 100 nM | 1000 nM |
|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| N = 5 | N = 3 | N = 5 | N = 5 |
| $0,62 \pm 0,04$ | $0,8 \pm 0,2$ | $0,26 \pm 0,06$ | $0,35 \pm 0,08$ |

[†] Résultats provenant de l'expérience illustrée à la figure 2.4

Notons d'ailleurs que le rinçage de l'expérience précédente, effectué à 10 nM d'Ag, indique une plus grande concentration que lorsqu'il n'y avait aucun rinçage (tableau 2.4, comparer les colonnes 1 et 2). Ceci laisse croire qu'il sera difficile de comparer des résultats provenant d'expériences distinctes, et cela même si les conditions expérimentales sont reproduites. En effet, plusieurs générations peuvent séparer deux cultures d'algues utilisées pour deux expériences distinctes et chaque culture peut posséder un profil de prise en charge légèrement différent. Pour permettre une meilleure comparaison des résultats, il a donc fallu faire des expériences en parallèle, c'est-à-dire utiliser la même culture d'algues en même temps dans différents milieux d'exposition ou pour différents traitements de rinçage.

C'est dans cet esprit que l'effet de la concentration d'Ag dans la solution de rinçage a été re-vérifié, cette fois en utilisant la même culture d'algues. Quatre concentrations ont été testées pour l'étape de rinçage : 0, 10, 100 et 1000 nM Ag. Les algues devant subir ces différents traitements ont été exposées préalablement à de l' ^{110m}Ag (10 nM Ag^+) pendant

10 minutes (N = 4). Chaque concentration d'Ag stable a été appliquée deux fois (10 mL chaque) pour un temps de contact total d'environ 6 minutes. Cette expérience a été répétée cinq fois et environ vingt minutes séparaient chaque rinçage pour une période totale de 100 min entre le début du premier rinçage et la fin du dernier (figure 2.5). Cette approche devait permettre de comparer en parallèle l'efficacité de désorption de l' ^{110m}Ag selon la concentration d'argent stable ajoutée à la solution de rinçage en utilisant une seule source homogène d'algues. Les résultats mettent cependant en lumière un aspect temporel important qui ne faisait pas partie de ce qui était recherché! En effet, à partir de du troisième rinçage, la prise en charge de l'Ag a décliné dans tous les cas indiquant que le temps d'attente des algues, une fois collectées et resuspendues, est important et devrait être le plus court possible. En ce qui concerne le type de rinçage, la tendance concorde avec l'expérience précédente, c'est-à-dire qu'une concentration de 100 nM Ag suffit pour déplacer le radio-isotope faiblement lié à la surface.

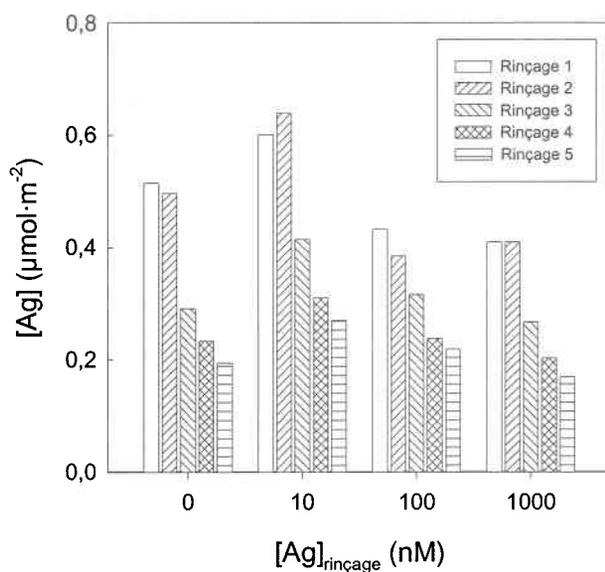


Figure 2.5 : Efficacité de désorption de l' ^{110m}Ag selon la concentration d'Ag dans la solution de rinçage et effet du temps d'attente des cellules avant l'exposition (20 min entre chaque rinçage) sur la prise en charge de l' ^{110m}Ag .

Cette efficacité a été confirmée de nouveau en comparant cette fois un rinçage à 100 nM d'Ag avec un rinçage à 10 μM de thiosulfate (cette concentration en $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ étant amplement suffisante pour complexer tout l'argent en solution), en utilisant toujours la même matrice d'exposition MHSM-1 décrite au tableau 2.1. Les mêmes conditions d'exposition ont été reproduites ($\text{pH} = 7$; $t = 10 \text{ min}$; $N = 4$; $[\text{Ag}^+] = 10 \text{ nM}$) en doublant toutefois le nombre de rinçages de 10 mL, passant de 2 à 4. L'accumulation moyenne (\pm écart-type) a été de $0,43 \pm 0,05$ contre $0,45 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ respectivement pour le rinçage avec l'isotope stable d'Ag et celui avec le thiosulfate de sodium, les deux taux d'accumulation n'étant pas significativement différents (test de Student; $P < 0,05$; figure 2.6). Le traitement à l'argent (quatre fois dix millilitres d'une durée totale de six minutes) a donc été retenu pour différencier entre le radio-isotope adsorbé et intracellulaire et a été utilisé de cette façon dans toutes les expériences ultérieures.

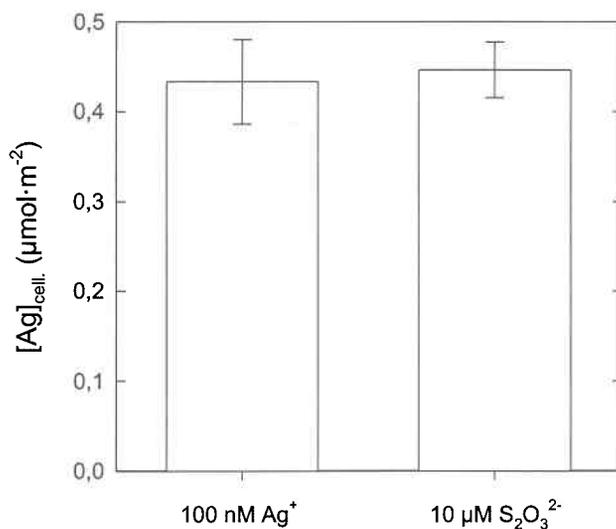


Figure 2.6 : Comparaison des résultats de prise en charge de l'argent (10 nM Ag^+ ; $5 \mu\text{M Cl}^-$) après 10 min d'exposition selon le type de rinçage (100 nM Ag^+ vs $10 \mu\text{M S}_2\text{O}_3^{2-}$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures.

Afin de s'assurer que ce traitement est également efficace lors d'expositions à l'Ag en présence de chlorure, cette dernière expérience a été répétée en remplaçant 4 mM de KNO_3 du milieu d'exposition MHSM-1 par 4 mM de KCl . Encore une fois, les deux types de rinçage ont révélé des niveaux d'Ag accumulés identiques, soit $1,6 \pm 0,2$ contre $1,5 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ respectivement pour le rinçage avec l'isotope stable d'Ag et celui avec le thiosulfate de sodium, les deux taux d'accumulation n'étant pas significativement différents (test de Student; $P < 0,05$; figure 2.7).

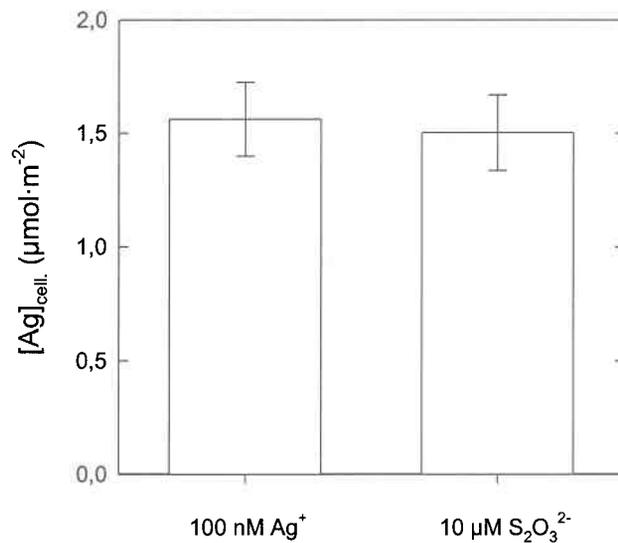
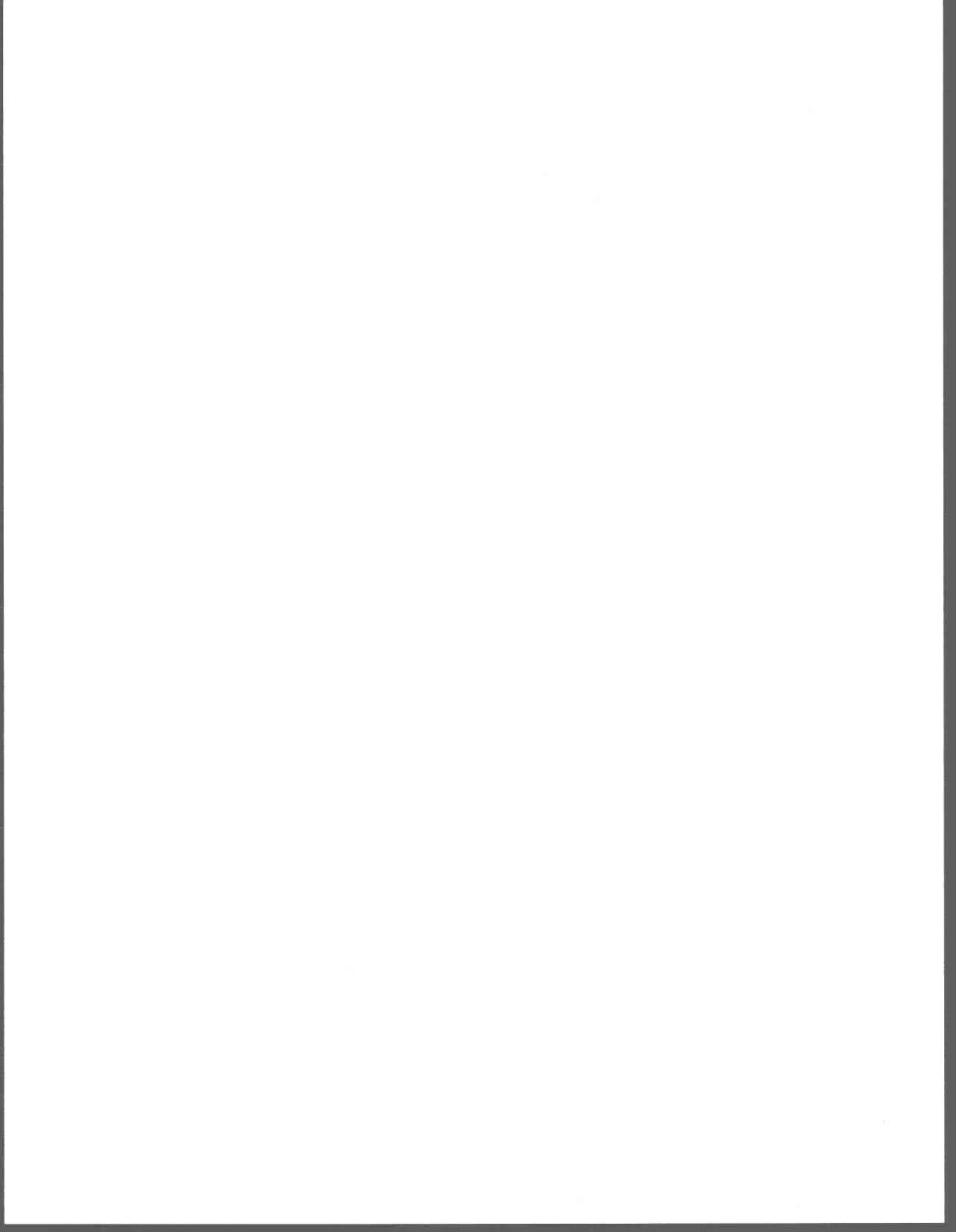


Figure 2.7 : Comparaison des résultats de prise en charge de l'argent (10 nM Ag^+ ; 4 mM Cl) après 10 min d'exposition selon le type de rinçage (100 nM Ag^+ vs $10 \mu\text{M S}_2\text{O}_3^{2-}$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures.

Ainsi, les deux types de rinçage ont été considérés comme équivalents et efficaces à déplacer le métal radioactif adsorbé à la paroi et à la membrane des cellules, ce qui permettait de déterminer la fraction intracellulaire. De façon générale, le rinçage à l'argent non radioactif a été préféré à celui avec le thiosulfate puisque ce dernier est métabolisable (voir annexe D).

2.9 Modélisation thermodynamique

L'argent est un élément peu soluble dans certaines conditions (en présence de chlorure par exemple), ce qui nécessite une bonne planification des expériences et un contrôle rigoureux de la spéciation chimique des milieux d'exposition. Les milieux d'exposition simplifiés permettent de bien connaître la spéciation de l'argent ajouté à ces milieux. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'équilibres chimiques (MINEQL+; Schecher et McAvoy, 1994) dont les constantes de formation avaient été vérifiées au préalable avec une base de données thermodynamiques fiables (Martell *et al.*, 1998; voir annexe A).



3. PRISE EN CHARGE DE L'ARGENT

3.1 Introduction

L'argent n'étant pas un micro-nutriment essentiel au développement des algues, on peut donc supposer qu'il entre dans les organismes en utilisant un système de transport qui n'a pas été conçu à cet effet (transport accidentel). Toutefois, la voie exacte de prise en charge de l'argent n'est pas connue chez les algues. Quelques études ont démontré des effets antagonistes entre le Cu et l'Ag sur l'accumulation et la toxicité chez les algues *Scenedesmus* et *Chlamydomonas* (Stokes, 1981; Howe et Merchant, 1992) de même que chez la bactérie *Escherichia coli* (Ghandour *et al.*, 1988) et chez les rats (Shavlovski *et al.*, 1995; Havelaar *et al.*, 1998). Des indications d'un transport accidentel de l'Ag par un système de transport du Cu(I) ont été obtenues chez des bactéries (Odermatt *et al.*, 1994; Solioz et Odermatt, 1995) et dans les cellules amniotiques humaines (Verheijen *et al.*, 1998). Chez les poissons, l'Ag interfère principalement avec le processus de régulation ionique branchiale par inhibition d'enzymes (localisées du côté basolatérale des branchies) nécessaires au transport des ions majeurs (Wood *et al.*, 1996a; Morgan *et al.*, 1997; Webb et Wood, 1998; Hogstrand et Wood, 1998; Bury *et al.*, 1999a; Wood *et al.*, 1999; Grosell *et al.*, 2000).

Avant de considérer les effets de différents ligands sur la prise en charge de l'argent (voir chapitres 4 et 5), il fallait : i) déterminer le profil d'accumulation en absence de ligand; ii) évaluer l'effet de l'agitation et de l'intensité lumineuse sur ce profil d'accumulation; et iii) déterminer la voie d'entrée de l'Ag⁺ chez *C. reinhardtii*.

3.2 Méthodologie

Tout d'abord, la prise en charge de l'argent en absence de ligands a été caractérisée. Dans cette première expérience, l'accumulation par les algues à différentes concentrations a été mesurée lors d'expériences de courte durée (10 min). Les concentrations nominales d'argent variaient de 1 à 30 nM. Notons que dans le milieu d'exposition simplifié

MHSM-1, l'argent est principalement (> 99 %) sous sa forme libre, tel que calculé à l'aide du logiciel MINEQL+. L'activité totale de ^{110m}Ag était mesurée avant et après l'exposition afin de s'assurer que la concentration d'argent n'avait pas diminué au cours de l'exposition. Une fois l'exposition terminée, les cellules étaient récupérées sur filtre et rincées afin de désorber l'argent radioactif de la surface, tel que décrit antérieurement (chapitre 2).

La cinétique d'accumulation de l' Ag^+ entre 0 et 60 minutes a par la suite été mesurée à une concentration fixe de 10 nM Ag^+ . Aucun ligand n'a été utilisé de sorte que pratiquement tout le métal était présent sous la forme de l'aquo-ion $\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_6^+$. Ainsi, trois filtrations en parallèle d'aliquots de 50 mL étaient effectuées successivement après 8, 25, 43 et 60 minutes d'exposition.

La cinétique de prise en charge de l' Ag^+ à une concentration fixe de 10 nM a été de nouveau mesurée mais dans des conditions d'exposition différentes. D'abord, l'effet de l'agitation a été mesuré en comparant l'accumulation d'argent par deux groupes d'algues. Dans le premier groupe, les flacons d'exposition étaient placés sur une table agitatrice (~ 50 rpm) alors que le deuxième groupe ne subissait aucune agitation. Dans un deuxième temps, l'effet de l'intensité lumineuse lors de l'exposition a été quantifié en exposant une partie des algues à un flux lumineux constant de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et en comparant les résultats avec ceux provenant d'algues exposées dans l'obscurité totale (bouteille HDPE opaque). Dans tous les cas, la concentration d' Ag^+ nominale était identique et fixée à 10 nM. Ainsi, les effets des conditions ambiantes sur le profil d'accumulation de l'argent par les algues ont pu être vérifiés.

Afin de tester les effets antagonistes potentiels qui pourraient nous informer sur la voie d'entrée de l'argent à l'intérieur des cellules, six éléments de transition (essentiels ou non) avoisinant l'argent dans le tableau périodique ont été sélectionnés pour ces tests : Ni, Zn, Cu, Cd, Co et Mn. Pour mesurer l'effet de chaque cation sur la prise en charge de l'argent (durée de 12 min), une concentration de 500 nM de chaque métal a été ajoutée à un milieu d'exposition contenant une concentration nominale de 10 nM Ag^+ . Toutefois,

contrairement à l'Ag, certains métaux, lorsqu'ajoutés au milieu d'exposition, peuvent former des complexes, ce qui pourrait influencer leur prise en charge et leur potentiel de compétition avec l'Ag. Par conséquent, afin d'éviter la présence d'hydroxo- et de carbonato-complexes, les expériences avec le Cu, le Ni ainsi que le Zn ont été réalisées à pH 5,0 alors que celles avec le Cd, le Mn et le Co se sont déroulées au pH habituel, soit 7,0. Ces métaux en milieu d'exposition MHSM-1 étaient ainsi tous principalement sous la forme libre (> 95 %), ce qui simplifiait l'interprétation des résultats. Un milieu témoin sans ajout de métal pour chaque pH permettait de déterminer l'influence du métal ajouté sur la prise en charge « normale » de l'argent. Dans tous les cas, les algues ont été cultivées à un pH de 7,0.

Tous ces métaux sont toutefois bivalents, alors que l'argent est un ion monovalent, principalement présent en milieu aqueux dans son état d'oxydation +1. On pourrait donc penser qu'un ion monovalent serait plus apte à entrer en compétition avec l'argent. C'est dans cette optique que l'accumulation d'Ag⁺ a été mesurée en présence de deux concentrations de K⁺, 4 mM et 100 mM (milieux MHSM-1 et MHSM-2; tableau 2.1). Il est à noter que dans ce cas, la force ionique n'est pas demeurée constante entre les deux expositions mais que les cellules utilisées provenaient de ces milieux de culture respectifs et donc étaient déjà adaptées à la force ionique du milieu d'exposition. Le profil de prise en charge a été établi en prélevant des aliquots de 50 mL, d'abord immédiatement après l'inoculation (t = 0), puis ensuite après 8, 25, 43 et 60 minutes d'exposition.

3.3 Résultats

3.3.1 Prise en charge de l'argent libre

La relation entre la concentration d'Ag⁺ et l'accumulation intracellulaire du métal a été vérifiée en trois étapes : d'abord à des concentrations nominales de 10, 20 et 30 nM Ag⁺ (carrés; figure 3.1A), puis à des concentrations plus faibles, soit 2,5, 5,0, 7,5 et 10 nM (triangles; figure 3.1A) ainsi qu'à 0,10, 0,50, 1,0 et 10 nM (cercles; figure 3.1A). Toutefois, la discontinuité des mesures entre chaque expérience a nécessité une reprise de cette expérience, mais cette fois en utilisant des cellules provenant du même lot de culture ([Ag⁺] = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 et 30 nM; figure 3.1B). Cette population homogène

d'algues a accumulé l'Ag⁺ de façon presque linéaire, avec seulement une légère tendance vers une saturation dans la gamme 10 → 25 nM, contrairement à ce qui aurait pu être conclu à partir d'une série d'expériences distinctes. Les concentrations d'Ag mesurées, légèrement inférieures (~ 70 %) aux valeurs nominales, ont été utilisées pour la présentation des résultats.

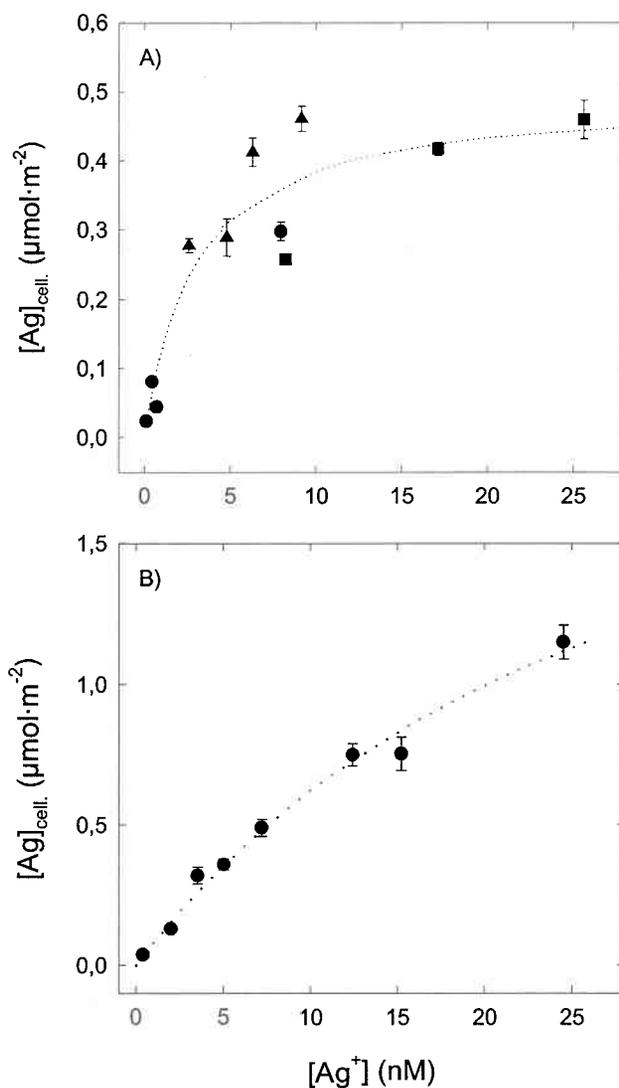


Figure 3.1 : Prise en charge de l'Ag par *C. reinhardtii* selon la concentration d'Ag⁺ à pH 7, après 10 minutes d'exposition dans le milieu MHSM-1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Ces expériences ont eu lieu dans le milieu MHSM-1, dont la concentration en chlorure est minimale ($[Cl^-] = 5 \mu M$). À cette concentration, la présence de chloro-complexes est négligeable ($< 1 \%$). La prise en charge à court terme (10 minutes) était mesurable à des concentrations aussi faibles que 1 nM Ag^+ et ne comportait qu'une faible marge d'erreur comme en font foi les barres d'erreur (figure 3.1B). L'écart-type sur la moyenne de trois mesures de prise en charge de l'Ag pour une exposition donnée représentait en moyenne une variation de 6 %.

Dans l'expérience cinétique, la prise en charge était rapide et linéaire sur une période d'exposition de 60 minutes (figure 3.2). Cette linéarité laisse croire qu'à cette concentration, le taux de sortie de l'Ag n'est pas important sur une heure.

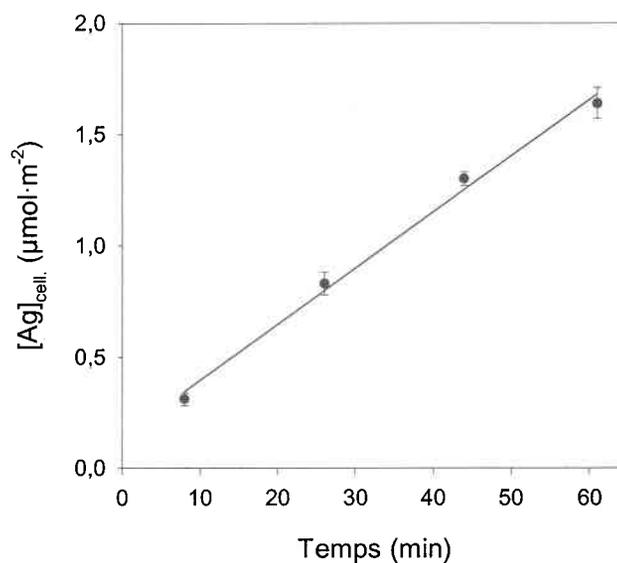


Figure 3.2 : Cinétique de prise en charge de l'Ag par *C. reinhardtii* en présence d'une concentration nominale de 10 nM Ag^+ en milieu MHSM-1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures.

Cette prise en charge ne semble pas être affectée par l'agitation ou non des flacons d'exposition (figure 3.3). En effet, la cinétique d'accumulation était identique chez les deux groupes d'algues, avec et sans agitation (voir annexe E). Ces résultats confirment du même coup la linéarité à l'intérieur d'une courte période de temps. Il est à noter également que les mesures initiales de prise en charge de l'argent ($t = 0,5 \text{ min}$) étaient très

faibles, démontrant que le rinçage à l'Ag non radioactif est efficace à désorber l'Ag retenu à la surface de l'algue.

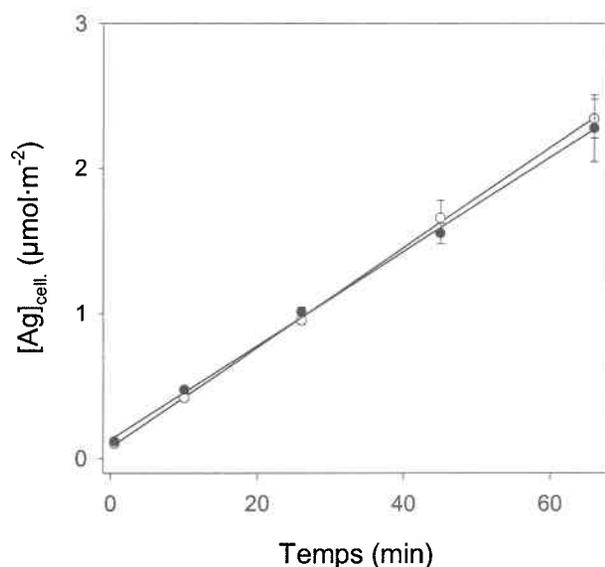


Figure 3.3 : Effet de l'agitation des flacons d'exposition (50 rpm) sur la cinétique de prise en charge de l'Ag à 8 nM Ag_{mes} . (● : sans agitation; ○ : avec agitation). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Dans le but de vérifier la sensibilité de la prise en charge de l'Ag à la lumière ambiante lors des expositions, une expérience de cinétique a été réalisée en présence ($\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et en absence de lumière. Deux milieux distincts ont été comparés. Le premier était en tout point identique à celui des deux expériences précédentes (figures 3.2 et 3.3) et ne contenait pas de ligand (i.e. $[Ag^+] = [Ag_T] = 10 \text{ nM}$). Le deuxième contenait un ligand : le chlorure (4 mM). Afin de conserver une force ionique constante, le KCl a été substitué au KNO_3 . De plus, puisque le chlorure complexe l'Ag, la concentration d'Ag était plus élevée dans ce milieu (104 nM) afin d'obtenir une concentration d' Ag^+ identique à celle du premier milieu.

Les résultats, tels que présentés à la figure 3.4, indiquent peu de différence entre la prise en charge de l'Ag en présence ou en absence de lumière, que ce soit à une haute (4 mM) ou faible (5 μM) concentration de chlorure. La présence de chlorure démontre toutefois

un effet important puisque la prise en charge augmente de façon marquée avec la concentration en chlorure pour une concentration d'Ag⁺ identique. Cette apparente exception au MIL sera abondamment discutée dans le prochain chapitre.

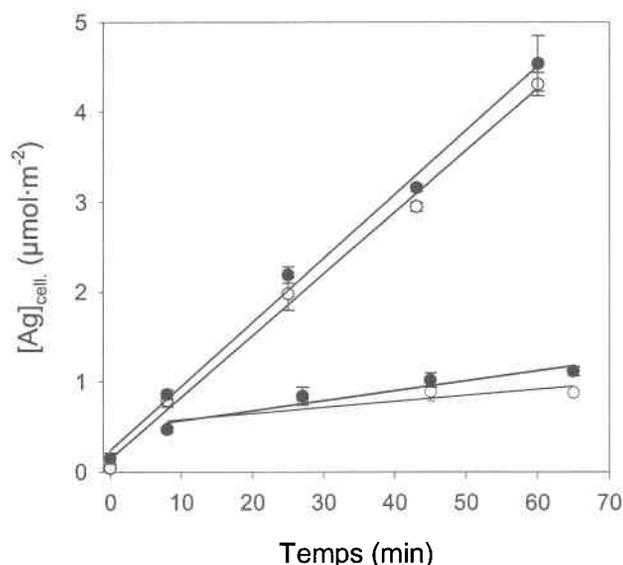


Figure 3.4 : Prise en charge de l'Ag en fonction du temps et du régime lumineux (● : obscurité; ○ : lumière) chez *C. reinhardtii* lors d'une exposition à 10 nM Ag⁺, à haute (4 mM; courbes du haut) et faible (5 μM; courbes du bas) concentrations de chlorure. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

3.3.2 Inhibition compétitive

L'inhibition de la prise en charge de l'Ag par d'autres métaux a été évaluée en combinaisons binaires Ag / métal à des concentrations respectives de 10 et 500 nM, en absence de ligands complexants. Les métaux testés étaient le Cd, le Co, le Cu, le Mn, le Ni et le Zn. De ces métaux, seul le Cu a eu un effet inhibiteur (baisse de 60 % de [Ag]_{cell.}) sur la prise en charge de l'Ag, alors que le Co et le Mn ont légèrement mais significativement stimulé l'accumulation de l'Ag (test de Tukey; $P < 0,05$). Les autres métaux n'ont eu aucun effet significatif (test de Tukey; $P > 0,05$) après 12 minutes d'exposition (figure 3.5).

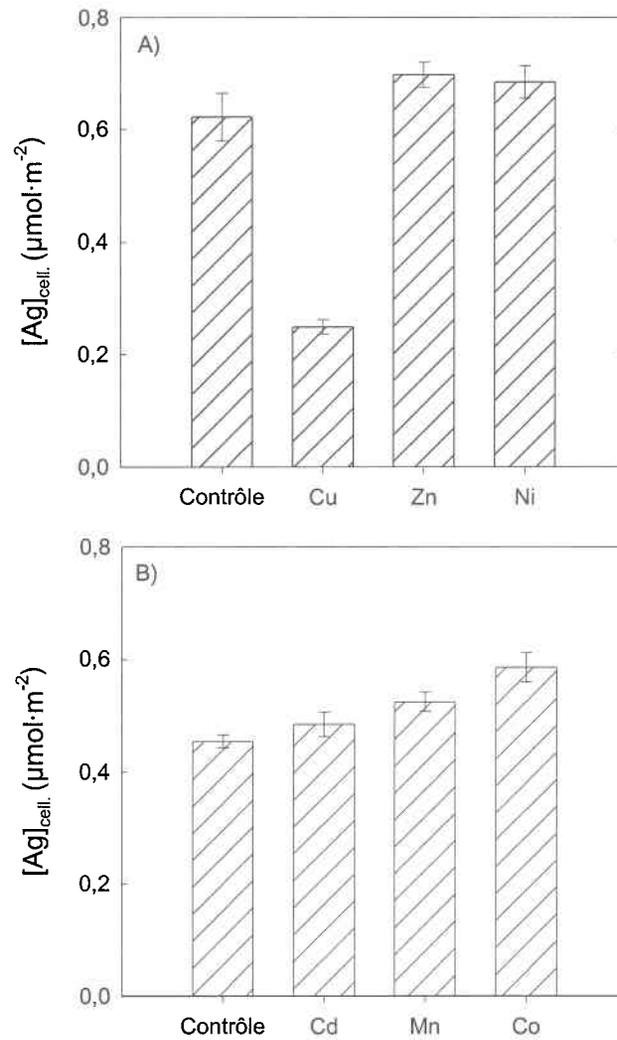


Figure 3.5 : Effet de certains métaux de transition (500 nM) sur la prise en charge de l'Ag (10 nM; 12 min). (A) Effet du Cu, du Zn et du Ni à pH 5. (B) Effet du Cd, du Mn et du Co à pH 7. Les contrôles représentent la prise en charge d'Ag en absence de ces métaux. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

De plus, le potassium n'a pas eu d'effet inhibiteur sur la prise en charge de l'Ag. En réalité, l'accumulation d'Ag était légèrement plus élevée dans le milieu contenant 25 fois plus de potassium (figure 3.6). Toutefois, cette différence est, somme toute, raisonnable puisque les cellules provenaient de milieux de culture différents, ce qui peut provoquer

des variations. On peut donc tout de même conclure que le potassium n'entre pas en compétition avec l' Ag^+ pour les sites de transport.

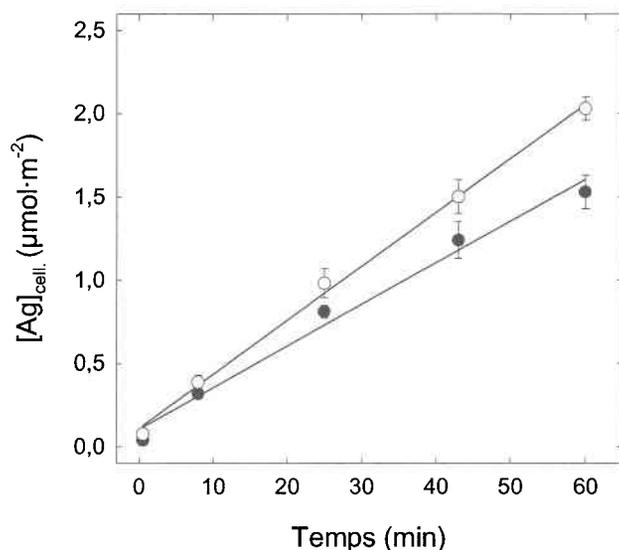


Figure 3.6 : Cinétique de la prise en charge de l' Ag^+ (10 nM) dans les milieux MHSM-1 (●) et MHSM-2 (○) dont les concentrations de K^+ sont respectivement de 4 et 100 mM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

3.4 Discussion

Comme en témoignent les taux de prise en charge lorsque $[\text{Ag}^+] \approx 10 \text{ nM}$, il existe une certaine discontinuité dans les valeurs de prise en charge mesurées dans des expériences séparées, avec des lots d'algues différents. Ceci confirme l'importance d'utiliser la même culture d'algues pour obtenir une comparaison soutenable (comparer les figures 3.1A et 3.1B). Les expériences de prise en charge réalisées avec des cellules vivantes devraient toujours être planifiées de sorte qu'une seule source homogène de cellules soit utilisée dans la comparaison de divers traitements. Cette approche permet de minimiser la variabilité inhérente aux organismes biologiques et d'éviter une mauvaise interprétation des résultats. Toute comparaison de résultats provenant d'algues cultivées séparément devrait donc être mise en perspective. Ainsi, afin de pouvoir quantifier l'effet d'un traitement particulier, les expériences ultérieures ont été, dans la mesure du possible,

élaborées en utilisant des lots de cellules homogènes et la prise en charge a été suivie dans tous les milieux d'exposition simultanément.

La figure 3.1B indique que le système de transport pour Ag^+ chez *C. reinhardtii* ne se sature pas dans la gamme de concentrations d' Ag^+ choisie. La plupart des expériences subséquentes ont donc été réalisées dans le portion linéaire de la prise en charge, à une concentration de ~ 10 nM.

Tous les résultats cinétiques (figures 3.2, 3.3, 3.4 et 3.6) font état d'une prise en charge rapide et presque linéaire à l'intérieur d'un temps d'exposition de 60 minutes. Cette linéarité contraste avec les résultats de Reinfelder et Chang (1999) qui indiquaient un plafonnement de la prise en charge après ~ 15 à 30 minutes. Ce désaccord n'est toutefois pas surprenant puisque ces chercheurs ont mesuré la prise en charge totale (intracellulaire et adsorbée) alors que dans la présente étude, seul la fraction intracellulaire a été mesurée. La combinaison des deux phénomènes (adsorption + absorption) risque de modifier l'allure des courbes d'accumulation et de masquer certaines tendances. D'ailleurs, les régressions linéaires des données mettent en évidence l'efficacité de l'étape de désorption de l'Ag lié à la surface des algues. En effet, l'adsorption des métaux aux surfaces algales étant un phénomène très rapide (Bates *et al.*, 1982; Schenck *et al.*, 1988; Knauer *et al.*, 1997a), la mesure initiale à $t \approx 0,5$ min aurait ainsi tendance à s'éloigner de l'origine en cas d'une désorption incomplète de l'Ag, ce qui n'est pas le cas.

La proportion d'Ag adsorbé à la surface des algues représentait environ 50 % de l'accumulation totale (adsorption + absorption) après 15 min d'exposition (voir section 2.8). Bien que cette proportion de métal adsorbé puisse paraître faible en comparaison avec d'autres métaux ($[\text{Zn}]_{\text{ads.}} \approx 90$ %; Bates *et al.*, 1982), elle est, en valeur absolue, plus élevée. En effet, les concentrations d'Ag pris en charge étant très élevées, la quantité totale d'argent adsorbée, normalisée pour la concentration d'exposition utilisée est en réalité supérieure à ce qui a été observé pour d'autres métaux tels le Cu, le Zn et le Mn (Bates *et al.*, 1982; Schenck *et al.*, 1988; Knauer *et al.*, 1997).

3.4.1 Voie d'entrée de l'Ag⁺

Comment est-ce que l'Ag pénètre à l'intérieur des algues en absence de ligand? Le transport doit forcément se faire accidentellement, par l'entremise d'un transporteur dédié à un (micro-)nutriment, puisque, dans l'état actuel de nos connaissances, l'Ag ne fait pas partie des éléments essentiels à la vie. Si ce transporteur distingue l'élément recherché de par sa charge ionique, celui du potassium serait un candidat possible au transport accidentel de l'Ag. Toutefois, une augmentation de la concentration de K⁺ par un facteur 25 n'a pas inhibé la prise en charge de l'Ag (figure 3.6). Pareillement, le Cd, le Co, le Mn, le Ni et le Zn n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'entrée de l'Ag dans les cellules. Seul le cuivre a eu un effet, diminuant de 60 % l'accumulation d'argent après 12 minutes d'exposition par rapport au contrôle. Le Cu pouvant être toxique envers les algues lorsque présent en trop grande concentration, cet effet aurait pu être attribué à un effet toxique du Cu. Toutefois, les travaux de Macfie *et al.* (1994) ont démontré que la toxicité du Cu était de beaucoup réduite à pH 5 (soit le pH spécifiquement utilisé pour cette expérience) comparativement à pH 7 (CE30 = 0,4 et 2,8 µM). La concentration de Cu utilisée ici (0,5 µM) étant nettement inférieure à ces seuils, la conclusion d'une compétition entre les deux métaux est plus convaincante. Ce résultat vient donc appuyer des observations précédentes sur les effets antagonistes entre le Cu et l'Ag (Stokes, 1981; Howe et Merchant, 1992; Ghandour *et al.*, 1988; Havelaar *et al.*, 1998). L'hypothèse d'un transport accidentel de l'Ag par un transporteur du Cu(I), tel que démontré chez des bactéries et des cellules humaines (Odermatt *et al.*, 1994; Solioz et Odermatt, 1995; Verheijen *et al.*, 1998), est attrayante. En effet, la forme réduite du Cu a en commun avec l'Ag plusieurs propriétés chimiques fondamentales (configuration électronique; charge ionique; affinité pour les groupements thiol et pour le chlorure) qui pourraient contribuer à la confusion entre le Cu(I) et l'Ag(I). Une question se pose toutefois : d'où viendrait le Cu(I)? On sait que le Cu(I) est instable en milieu oxygène et qu'il s'oxyde très rapidement en Cu(II). Cependant, la réduction du Cu(II) en Cu(I) peut se faire par voie biologique, ce qui établirait une concentration de Cu(I) non-négligeable à l'état stationnaire à l'intérieur de la phycosphère. En effet, la réductase du Cu à la surface de *C. reinhardtii* est maintenant bien documentée (Hill *et al.*, 1996; Eckhardt et Buckhout, 1998; Weger, 1999), ce qui implique la présence d'un système de transport du Cu(I) chez cette algue.

L'activité enzymatique a été mesurée par Weger (1999), qui a obtenu un taux de réduction du Cu(II) de $25 \text{ nmol Cu}^+ \cdot 10^6 \text{ cell.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour une concentration de Cu^{2+} de $0,10 \text{ } \mu\text{M}$. En appliquant ce taux aux conditions expérimentales lors de l'exposition au Cu (figure 3.5A), la concentration totale de Cu(I) après 12 minutes atteindrait 50 nM à une densité cellulaire de $10\,000 \text{ cell.} \cdot \text{mL}^{-1}$, ce qui est du même ordre de grandeur que la concentration d'Ag utilisée (10 nM). De plus, la constante de demi-saturation (K_m) de prise en charge du Cu chez *C. reinhardtii* est de 210 nM (exprimée en Cu(II); Hill *et al.*, 1996). On peut donc s'attendre à ce qu'à 500 nM de Cu le transporteur soit saturé à plus de 50% (i.e. saturation à $\sim 70 \%$ en présence de 500 nM), ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus qui estiment l'inhibition du transport de l'Ag à 60% . La combinaison de toute ces informations porte à croire que le transport de l'Ag vers l'intérieur de l'algue *C. reinhardtii* par un système de transport pour le Cu(I) est un mécanisme plausible.

3.5 Conclusion

La prise en charge de Ag^+ par l'algue *C. reinhardtii* est rapide et linéaire sur une période d'une heure et à des concentrations inférieures à $\sim 10 \text{ nM}$. Ni l'agitation, ni l'intensité lumineuse n'a d'effet sur les taux de prise en charge à court terme. Toutefois, une certaine variabilité inter-générationnelle a été remarquée dans les résultats, nécessitant que les expériences visant à démontrer l'effet d'un traitement particulier soient réalisées en parallèle avec un milieu d'exposition de référence.

De tous les éléments testés, seul le Cu a démontré un effet antagoniste sur la prise en charge de l'Ag. Cette observation, combinée à la présence d'une enzyme réductrice du Cu(II) en Cu(I) chez l'algue *C. reinhardtii*, suggère que la voie d'entrée de Ag^+ est celle servant à transporté le Cu(I). Il s'agirait donc d'un mécanisme de transport accidentel de cation.

4. EFFET DU CHLORURE

4.1 Introduction

Le modèle de l'ion libre (MIL) s'appuie sur une multitude de résultats indiquant que la concentration totale d'un métal n'est pas représentative de la biodisponibilité de celui-ci, et que la spéciation du métal affecte grandement sa disponibilité envers les organismes aquatiques. Ainsi, dans la plupart des cas, la prise en charge et la toxicité d'un métal devraient varier en fonction de la concentration de métal libre en solution (Morel et Hering, 1993; Campbell, 1995).² Cependant, très peu d'études appuyant le MIL ont été réalisées avec l'argent. La spéciation de ce métal peut être fortement influencée par des ligands inorganiques simples, tels le sulfure, le thiosulfate et le chlorure. Ce dernier anion est omniprésent en milieu naturel avec des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M en eau douce, ou même plus dans le cas de certains plans d'eau situés en bordure de routes où l'utilisation de sels déglaçants peut contribuer significativement à l'apport en chlorure. On le retrouve également en grande concentration dans les eaux d'égouts et les rejets industriels. Le chlorure forme avec l'argent une série de chloro-complexes stables (AgCl^0 , AgCl_2^- : $\log K_1 = 3.31$, $\log \beta_2 = 5.25$). Ainsi, selon le MIL, la complexation de l'argent par le chlorure devrait réduire sa biodisponibilité. Toutefois, peu de preuves expérimentales supportent cette prédiction de façon quantitative. Dans une série d'expériences sur le crustacé *Palaemonetes pugio*, Engel *et al.* (1981) ont étudié l'influence de la salinité sur la prise en charge de l'argent radioactif après quatre jours d'exposition. Tel qu'ils l'avaient observé précédemment pour le Cd (Sunda *et al.*, 1978), la bioaccumulation de l'argent a diminué avec la salinité. En revanche, contrairement à ce qui avait été observé pour le Cd, l'accumulation de l'Ag après quatre jours était mieux corrélée à la concentration du complexe neutre, AgCl^0 , qu'à la concentration de métal libre, Ag^+ . Les auteurs ont suggéré que cette relation avec AgCl^0 reflétait la lipophilicité du complexe neutre, contribuant à la prise en charge de l'Ag. Cette première observation

² Toutefois, un certain nombre d'exceptions à ce modèle ont été documentées. Une de celles-ci concerne les milieux contenant des complexes lipophiles, $M-L_n^0$, lesquels peuvent traverser simplement la membrane plasmique par diffusion passive (Phinney et Bruland 1994; Mason *et al.*, 1996), sans passer par les transporteurs protéiques, voies d'entrées normales pour les métaux.

n'a pas suscité de nouvelles expériences dans la décennie qui a suivie afin d'infirmier ou confirmer ces résultats. Ce n'est que tout récemment que le système Ag / Cl a été étudié de nouveau. Ces publications récentes se sont avérées plutôt discordantes quant à l'effet du chlorure sur la toxicité de l'argent envers les poissons. Hogstrand *et al.* (1996) ont rapporté que le chlorure apportait une protection virtuellement complète à l'argent chez les truites arc-en-ciel juvéniles (*Oncorhynchus mykiss*). À des concentrations dissoutes d'Ag allant jusqu'à 1,1 μM , aucune mortalité n'a été observée après sept jours dans un milieu contenant 50 mM de chlorure. Toutefois, dans ces conditions, l'argent était accumulé par les organismes, indiquant un découplage entre accumulation et toxicité de l'Ag. À l'opposé, Erickson *et al.* (1998) ont rapporté que l'ajout de chlorure augmentait la toxicité aiguë de l'Ag envers les têtes-de-boules juvéniles (*Pimephales promelas*). Cette différence entre les deux espèces a ensuite été confirmée par Bury *et al.* (1999b). Récemment, Reinfelder et Chang (1999) ont étudié la prise en charge de l'argent par une diatomée euryhaline, *Thalassiosira weissflogii*, en fonction de la salinité. Leurs travaux ont indiqué des taux de prise en charge de l'Ag plus élevés à une concentration intermédiaire de chlorure de 5 mM qu'à une concentration plus faible (0,5 mM) ou plus élevée (50 mM). La spéciation de l'Ag étant dominée par l'espèce neutre AgCl^0 lorsque la concentration de chlorure est de 5 mM, ces auteurs ont conclu que la prise en charge de l'Ag était contrôlée par la diffusion passive de l'espèce AgCl^0 . Toutefois, les facteurs de concentration volumique (VCF) mesurés étaient constants pour toutes les concentrations de chlorure testées, suggérant que la concentration intracellulaire d'Ag était régulée par l'algue malgré des taux de prise en charge différents.

C'est dans ce contexte équivoque que l'hypothèse de la diffusion passive de l'espèce neutre AgCl^0 a été testée. Les objectifs de cette partie de la thèse étaient : i) de déterminer si le chlorure provoque une augmentation de la prise en charge de l'argent et, advenant une réponse positive à cette première question; ii) de déterminer si cette augmentation résulte de la diffusion passive du complexe AgCl^0 ou si elle découle d'un autre mécanisme.

4.2 Méthodologie

4.2.1 Prise en charge de l'Ag

La cinétique de prise en charge de l'Ag (0 – 60 min) a d'abord été simultanément mesurée à deux concentrations de chlorure : 5 μM et 4 mM. Afin de maintenir la concentration de métal libre à un niveau constant dans chaque milieu (10 nM Ag^+), la concentration totale en argent a été augmentée à 104 nM dans le milieu contenant la concentration élevée de chlorure. La force ionique des milieux a été maintenue fixe à 6 ou 100 $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ (selon le milieu : MHSM-1 ou MHSM-2; voir tableaux 2.1 et 2.2) en remplaçant le nitrate par du chlorure dans les milieux aux concentrations de chlorure élevées.

Puisque le design expérimental utilisé dans cette exposition à une concentration fixe d' Ag^+ implique le remplacement graduel du nitrate par le chlorure, la possibilité d'un effet général de la salinité sur la perméabilité membranaire a été vérifiée. Pour ce faire, la prise en charge du Mn^{2+} , un cation dont l'affinité pour le chlorure est minime, a été mesurée dans des conditions similaires. Les concentrations totales de Mn (20 nM) étaient identiques dans les deux milieux contenant respectivement 5 μM et 4 mM de chlorure et correspondaient aux concentrations de Mn^{2+} , puisque la spéciation de ce dernier n'est pas affectée par la présence de 4 mM Cl^- ($\log K_{\text{MnCl}} = 0,1$; Martell *et al.*, 1998). Trois aliquots de 50 mL ont été prélevés à 0, 9, 25, 43 et 60 minutes après inoculation à une densité cellulaire de 20 000 $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le ^{54}Mn adsorbé à la surface des cellules a été retranché en les rinçant avec un milieu de culture simplifié contenant 10^{-5} M EDTA (concentration à laquelle > 99 % du Mn est lié à l'EDTA, sans que la concentration de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} ne soit affectée; Schenck *et al.*, 1988).

4.2.2 Expérience de type pulse-chase

Cette expérience a été planifiée afin de suivre le taux d'internalisation de l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ après avoir resuspendu les cellules dans un milieu non radioactif. Dans un premier temps, les algues ont été exposées à 8 nM d'Ag radioactif dans un grand volume de milieu MHSM-1. Trois aliquots de 50 mL ont été prélevés au début de l'expérience ainsi qu'après 15, 30, 52 et 75 minutes. Après 15 minutes, 500 mL de la solution d'exposition

ont été rapidement filtrés (2 μm) et les cellules récoltées ont été resuspendues en moins de deux minutes dans un milieu d'exposition identique ne contenant toutefois que de l'Ag non radioactif. Afin de quantifier l'impact de l'étape de filtration sur les cellules, une deuxième fraction de 500 mL a également été filtrée (2 μm) et les cellules ont été resuspendues dans le filtrat. Par la suite, de nouveaux échantillons ont été prélevés successivement de chaque milieu 30, 52 et 75 minutes après l'inoculation initiale des cellules (figure 4.1). Par conséquent, ces mesures procurent une courbe d'accumulation se séparant en trois après 15 minutes : algues dans leur milieu d'incubation original, sans perturbation; algues ayant subi l'étape de filtration / resuspension, mais toujours exposées à l'argent radioactif; algues ayant subi l'étape de filtration / resuspension et ayant été exposées à l'argent non radioactif suite à la période initiale de 15 min.

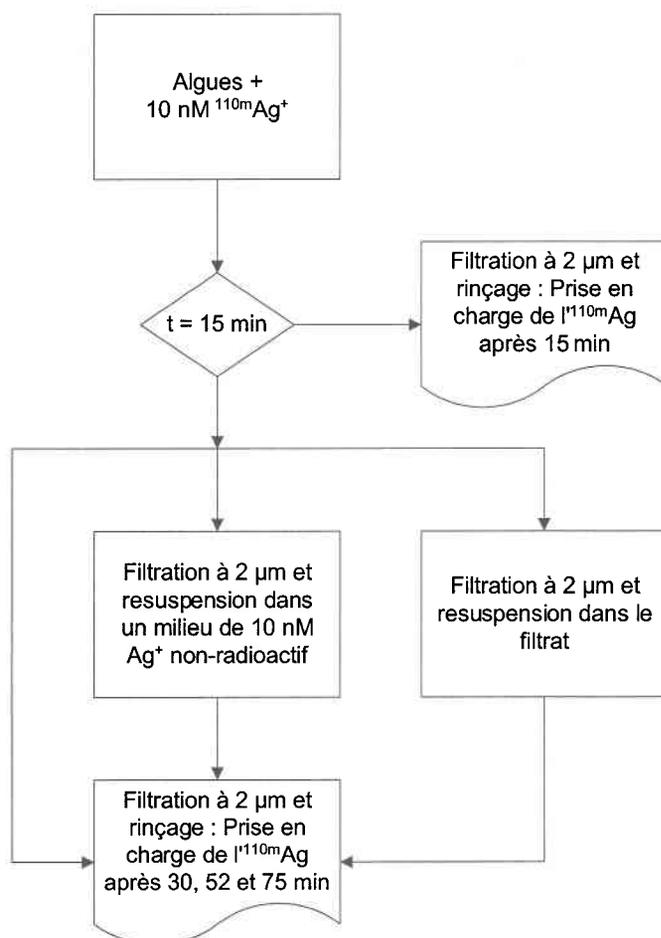


Figure 4.1 : Ordre séquentiel des manipulations lors de l'expérience de type « pulse-chase ».

4.2.3 Test de diffusion passive

Cette expérience a été planifiée afin de vérifier si la diffusion passive de l'espèce neutre AgCl^0 pouvait expliquer l'augmentation de prise en charge observée en présence de chlorure. L'objectif de cette expérience était d'inhiber l'accumulation médiée de l'ion $^{110\text{m}}\text{Ag}^+$, et ce, en utilisant de l'Ag non radioactif. Trois milieux d'exposition dans lesquels la concentration libre d' $^{110\text{m}}\text{Ag}^+$ a été maintenue constante à 2 nM ont été comparés. Dans le milieu A, une concentration minimale de chlorure (5 μM) a été utilisée et la concentration totale d' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ était de 2 nM. Dans le milieu B, 4 mM de chlorure était présent, nécessitant une concentration totale d' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ de 21 nM pour maintenir la concentration d'argent libre constante avec le milieu A. Finalement, le milieu C était identique au milieu B excepté pour un ajout de 414 nM d'argent non radioactif, diluant ainsi l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ par 20 fois. L'argent non radioactif ajouté entraine donc en compétition avec l'argent radioactif pour les sites de prise en charge, ce qui avait pour effet de supprimer le transport médié de l' $^{110\text{m}}\text{Ag}$ sinon entièrement, à tout le moins partiellement selon le degré de saturation atteint sur les sites de transport. Seul l'argent radioactif est mesuré par spectrométrie gamma, permettant ainsi de distinguer le métal radioactif du métal stable, et les concentrations étaient déterminées en utilisant l'activité spécifique originale de la solution. Il est important de noter que l'ajout d'un excès d'argent froid ne modifie en rien la spéciation de l'Ag puisque le ratio métal : ligand demeure très faible ($\sim 10^{-4}$); les proportions des différents chloro-complexes demeurent donc inchangées. La diffusion passive du complexe non chargé $^{110\text{m}}\text{AgCl}^0$, si diffusion il y a, ne sera également pas touchée par cet excès d'argent froid, puisque la prise en charge est exclusivement contrôlée par le gradient de concentration de la forme $^{110\text{m}}\text{AgCl}^0$. Donc, une multiplication par 20 de la concentration de l'espèce neutre AgCl^0 augmentera d'autant la prise en charge de cette espèce; toutefois, en ne mesurant que 1 / 20^e de cette accumulation par le truchement de l'argent radioactif, la prise en charge de l' $^{110\text{m}}\text{AgCl}^0$ demeurera inchangée. Le tableau 4.1 résume les concentrations des espèces clés présentes dans les milieux d'exposition. Après 13 minutes d'exposition, quatre aliquots de 100 mL ont été prélevés de chaque milieu et les cellules ont été récoltées et rincées selon le protocole habituel (chapitre 2).

Tableau 4.1 : Paramètres d'exposition de l'expérience d'inhibition de prise en charge de l'Ag⁺ par ajout d'Ag non radioactif

| Milieu | A | B | C |
|--|---|------|------|
| [Ag ⁺] _{calculée} (nM) | 2 | 2 | 40 |
| [^{110m} Ag ⁺] _{calculée} (nM) | 2 | 2 | 2 |
| [^{110m} Ag _T] _{mesurée} (nM) | 2 | 19 | 21 |
| [Ag _T] _{nominal} (nM) | 2 | 21 | 435 |
| [Cl ⁻] _{nominal} (μM) | 5 | 4000 | 4000 |

4.2.4 Effet de la concentration de ligand sur la prise en charge de l'argent

Deux designs expérimentaux ont été utilisés afin de déterminer l'effet de la concentration de ligand sur la prise en charge de l'argent. Dans le premier design, la concentration totale d'argent a été fixée pendant que celle du chlorure variait. En utilisant une large gamme de concentrations de chlorure (0,005, 0,5, 5 et 50 mM), où les espèces dominantes se succédant sont : Ag⁺ → AgCl⁰ → AgCl₂⁻, on a voulu déterminer l'influence de tels changements de spéciation sur la prise en charge de l'Ag; deux concentrations totales d'argent ont été testées (10 et 115 nM). Ces expériences se sont déroulées sur une période de 15 minutes dans le milieu MHSM-2.

Dans le deuxième design d'expérience, la concentration d'argent libre a été fixée à 10 nM mais on augmentait simultanément les concentrations de ligand et d'argent total. La prise en charge de l'argent a été mesurée dans trois séries d'expériences. Lors de la première série, le chlorure a été utilisé comme ligand et les combinaisons respectives d'argent et de chlorure étaient : 10 nM / 0,005 mM; 50 nM / 2 mM; et 104 nM / 4 mM. Pour la deuxième série, le thiosulfate a été utilisé comme ligand dans la même gamme de concentrations d'Ag, formant des complexes AgS₂O₃⁻ ([S₂O₃²⁻] = 0, 40, 80 et 114 nM; [Ag] = 10, 43, 76 et 104 nM). Finalement, dans la troisième série, des concentrations plus élevées de thiosulfate ont été testées (0, 1, 5 et 10 μM), avec une concentration croissante d'Ag (0,01, 0,74, 3,6 et 7,0 μM). Pour toutes ces expériences, les concentrations de métal et de ligand ont été choisies de façon à ce que les concentrations d'Ag⁺ demeurent

constantes à 10 nM. La concentration d'argent intracellulaire a été déterminée après 10 minutes d'exposition dans un milieu MHSM-1.

4.3 Résultats

Deux approches ont été utilisées pour déterminer l'influence du chlorure sur la prise en charge de l'argent : d'abord en fixant la concentration d' Ag^+ en covariant les concentrations de chlorure et d'argent total, ensuite en fixant la concentration totale d'argent tout en variant la concentration de chlorure.

Dans la première approche, la prise en charge de l'argent à une concentration fixe de ~ 9 nM Ag^+ en présence de $5 \mu\text{M}$ et 4mM de chlorure a été mesurée. À $5 \mu\text{M}$ de chlorure, la complexation est négligeable alors qu'à 4mM , la proportion relative calculée des différentes espèces d'argent est de 10 % Ag^+ , 67 % AgCl^0 et 23 % AgCl_2^- . Tel qu'illustré à la figure 4.2A, l'ajout de chlorure au milieu d'exposition MHSM-1 a un effet prononcé sur la prise en charge de l'Ag. Dans les premières 25 minutes, la prise en charge est 3,9 fois plus grande dans le milieu où la concentration en chlorure est plus élevée et ce malgré une concentration d' Ag^+ identique dans les deux milieux. Il est à noter que le même écart subsiste dans le milieu MHSM-2 de force ionique plus élevée (figure 4.2B). En effet, l'augmentation de la prise en charge par la présence de chlorure (4mM) y était encore plus grande (4,6 fois à $t = 60 \text{min}$).

Dans la deuxième approche, deux concentrations totales constantes de 10 et 115 nM ont été utilisées tout en variant la concentration de chlorure entre $5 \mu\text{M}$ et 50mM , afin de faire varier les proportions relatives des différents chloro-complexes. Malgré les changements majeurs qui se produisent dans la spéciation de l'Ag à l'intérieur de cette large gamme de concentrations de chlorure, la prise en charge est demeurée relativement inchangée (figure 4.3). Par exemple, pour les essais à 10 nM Ag_T , l'accumulation de l'argent n'a diminué que de 20 à 35 % selon l'expérience, alors que la concentration d' Ag^+ a chuté de 325 X, celle d' AgCl^0 a augmenté de 31 X, et celle d' AgCl_2^- a augmenté de $10^{5,5}$ X. La diminution à 115 nM Ag_T était plus importante ($\sim 50 \%$) mais toujours de loin inférieure à celle prédite en fonction de la concentration d' Ag^+ . Il est à noter

qu'aucune relation n'a été observée entre la prise en charge de l'argent et les variations en concentrations d' AgCl^0 et d' Ag^+ .

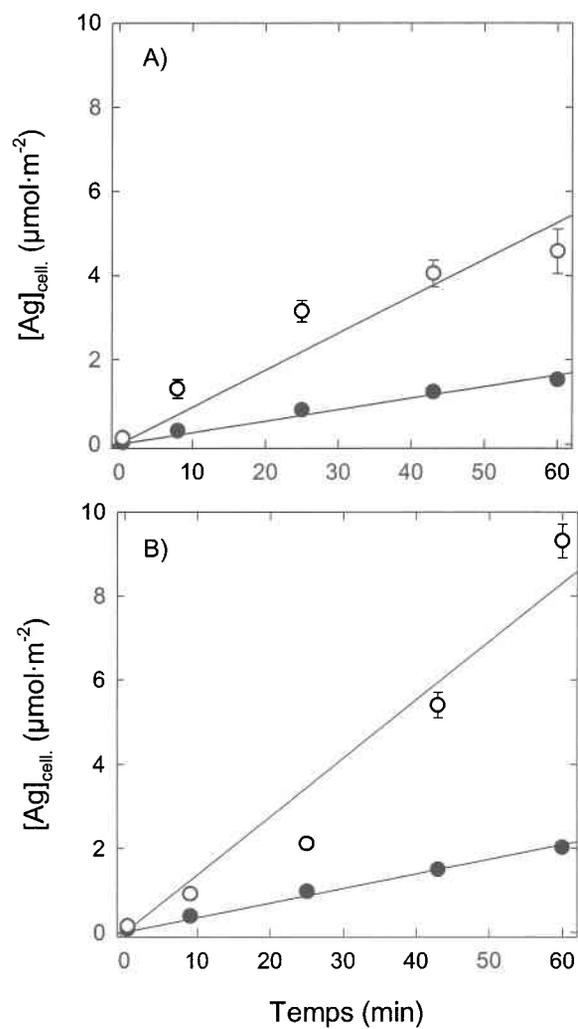


Figure 4.2 : Cinétique de prise en charge de l'Ag à concentration d' Ag^+ constante (9 nM) à faible (● : $5 \mu\text{M Cl}$) et à haute (○ : 4 mM Cl) concentrations de chlorure. (A) Prise en charge à faible force ionique (milieu MHSM-1; $I = 6 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$); (B) Prise en charge à haute force ionique (milieu MHSM-2; $I = 100 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

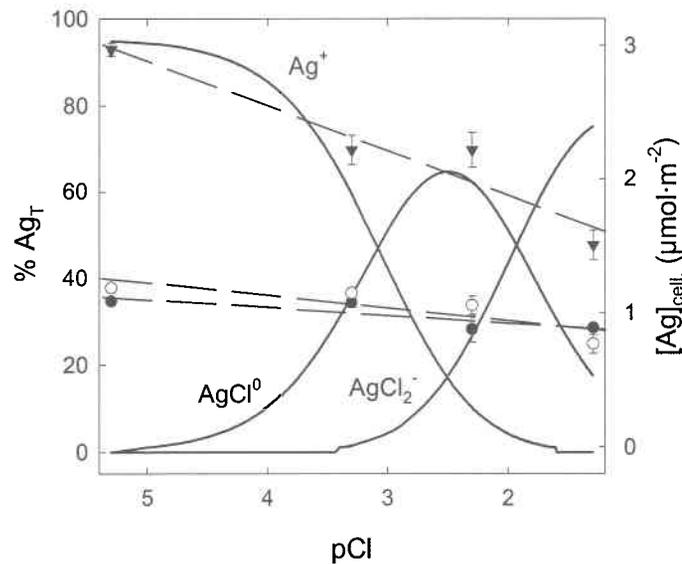


Figure 4.3 : Accumulation d'Ag à temps court (15 min) en fonction de pCl ($-\log \{Cl\}$) à 10 nM (●, ○) et 115 nM (▼) Ag_T (échelle de droite). Distribution des différentes espèces d'Ag calculée en fonction de pCl à l'aide de MINEQL+ (courbes se référant à l'échelle de gauche). Les symboles noirs désignent les résultats obtenus avec la même culture d'algues. Les lignes pointillées représentent les régressions linéaires des données. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 4.2 : Prise en charge de l'Ag après 15 minutes d'exposition à des concentrations croissantes de chlorure en fonction de la spéciation calculée (MINEQL+) entre 10 et 40 mM Cl^- (milieu MHSM-2).

| [Cl] (mM) | [Ag_T] _{mes.} (nM) | [Ag^+] _{calc.} (nM) | [$AgCl^0$] _{calc.} (nM) | [$AgCl_2^-$] _{calc.} (nM) | [$AgCl_3^{2-}$] _{calc.} (nM) | [Ag] _{cell.} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|--|--|
| 10 | 9,1 | 0,38 | 4,7 | 4,0 | 0,06 | $0,48 \pm 0,02$ |
| 20 | 9,4 | 0,14 | 3,3 | 5,7 | 0,17 | $0,45 \pm 0,08$ |
| 30 | 9,3 | 0,07 | 2,5 | 6,4 | 0,28 | $0,51 \pm 0,04$ |
| 40 | 8,8 | 0,04 | 1,9 | 6,4 | 0,37 | $0,51 \pm 0,05$ |
| Changements relatifs | | ↓ 9,5 X | ↓ 2,5 X | ↑ 1,6 X | ↑ 6,2 X | - |

Lors d'une autre expérience semblable, mais dans une gamme plus étroite de concentrations de chlorure où la proportion de l'espèce AgCl^0 diminue, aucune différence significative (ANOVA; $P = 0,472$) n'a été détectée entre les valeurs de prise en charge de l'Ag (tableau 4.2).

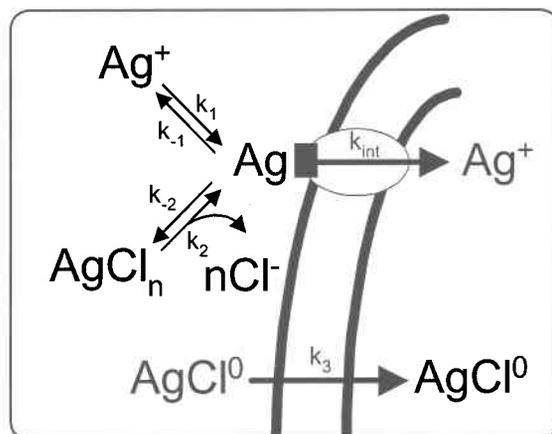


Figure 4.4 : Modèle conceptuel des interactions entre l'Ag et la membrane plasmique d'une algue en présence de chlorure. En haut : liaison de l'argent avec un système de transport (ellipse). En bas : diffusion passive du complexe neutre, présumé être lipophile, à travers la bi-couche lipidique.

4.3.1 Expérience de type « pulse-chase »

Cette expérience a été planifiée pour faire suite aux expériences de prise en charge. Étant donné que le taux de prise en charge de l'Ag est très rapide (~ 8000 fois plus grand que celui du Cd pour la même espèce d'algue; Vigneault, 2000), il nous semblait possible que l'étape d'internalisation de l'Ag soit plus rapide que son échange avec le milieu externe, contrairement à ce que dicte la prémisse du MIL (voir figure 4.4 : k_{-1} et $k_2 < k_{int}$). Cette expérience est sensiblement similaire à celle réalisée par Hudson et Morel (1990) qui ont démontré que l'internalisation du fer (k_{int}) était plus rapide que les réactions d'échange entre le transporteur et le milieu ambiant. Toutefois, contrairement aux résultats observés dans le cas du fer, l'accumulation d' ^{110m}Ag par les algues n'a pratiquement pas augmenté après les étapes de récolte et de resuspension dans le milieu non radioactif (figure 4.5, courbe D : augmentation de 15 % entre 15 et 30 minutes – mais non significative; test de Student; $P = 0,089$ – puis aucun changement par la suite), confirmant ainsi que k_{-1} ou $k_2 \geq k_{int}$. La quantité d'Ag adsorbé à la surface a préalablement été évaluée à $0,36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.

(voir section 2.8); l'accumulation maximale aurait donc pu atteindre $0,91 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ (figure 4.5, courbe C). Les algues qui ont été récoltées et resuspendues dans leur milieu original ont continué d'accumuler l'argent de façon linéaire dans la période de 20 à 60 minutes (figure 4.5, courbe B), indiquant que les étapes de récolte sur filtre et de resuspension n'ont pas abîmé les cellules.

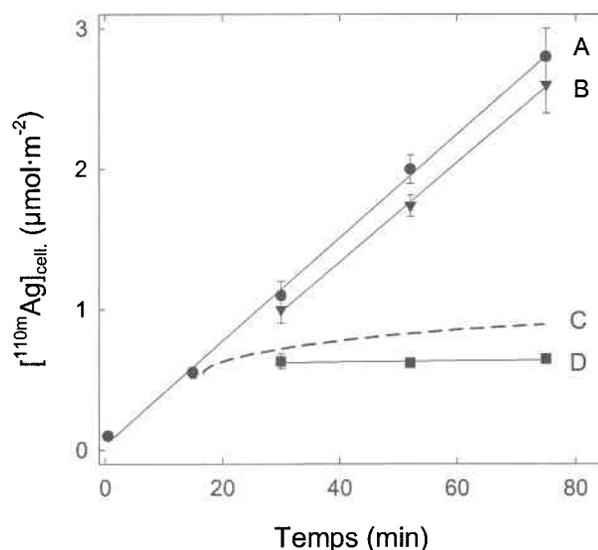


Figure 4.5 : Accumulation intracellulaire d' ^{110m}Ag avec et sans resuspension après 15 minutes lors de l'expérience « pulse-chase ». (A) : Cellules de référence non manipulées. (B) : Cellules récoltées et resuspendues dans leur filtrat radioactif. (C) : Cellules récoltées et resuspendues en milieu non radioactif (courbe hypothétique si k_1 et $k_2 \ll k_{\text{int}}$). (D) : Cellules récoltées et resuspendues en milieu non radioactif (courbe observée). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Enfin, une autre expérience a été planifiée afin de déterminer si la diffusion passive de l'espèce neutre, AgCl^0 , pouvait expliquer l'accumulation accrue observée en présence de 4 mM de chlorure. L'objectif était d'inhiber la prise en charge de $^{110m}\text{Ag}^+$, en ajoutant un excès d'argent non radioactif. Tel qu'attendu, la prise en charge de ^{110m}Ag après 13 minutes était environ 2 fois plus élevée dans le milieu B contenant 4 mM de chlorure que dans le milieu A ne contenant que 5 μM de chlorure (figure 4.6, $0,69 \pm 0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ vs $0,35 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, c'est-à-dire, une accumulation accrue de $0,34 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ en présence de 4 mM de chlorure). Si cette différence était attribuable à la diffusion passive de la

forme AgCl^0 , on se serait attendu à mesurer, dans le milieu C, une prise en charge plus grande ou égale à cette différence. Cependant, la prise en charge de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ dans le milieu C ($0,13 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) était plus petite que la différence d'accumulation dans les deux premiers milieux.

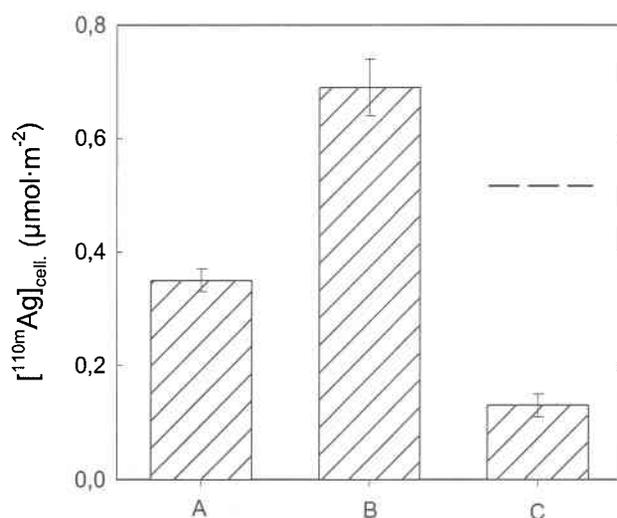


Figure 4.6 : Effet de l'ajout d'un excès d'argent non radioactif sur la prise en charge de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ par *C. reinhardtii*. Chaque milieu avait une concentration de $^{110\text{m}}\text{Ag}^+$ de 2 nM. Le milieu A contenait peu de chlorure (5 μM) et une concentration totale de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ de 2 nM. Le milieu B contenait 4 mM de chlorure et une concentration totale de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ de 21 nM. Le milieu C était identique au milieu B à l'exception d'un ajout d'Ag non radioactif de 414 nM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de quatre mesures. La ligne pointillée fait référence au niveau de prise en charge de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ attendu dans le milieu C si la différence entre A et B était due à la présence d'un mécanisme de diffusion passive (voir Discussion).

4.3.2 Effet du chlorure sur la prise en charge du Mn

La cinétique de prise en charge du Mn (0 à 60 min) a été mesurée à deux concentrations de chlorure : 5 μM et 4 mM. Il est à souligner également que la prise en charge du Mn était beaucoup plus faible que celle de l'Ag (comparer les ordonnées des figures 4.2 et 4.7; une différence d'environ 500 X). Pendant les 25 premières minutes d'exposition, l'augmentation de la concentration en chlorure par un facteur 800 n'a pas eu d'effet sur la prise en charge du Mn (figure 4.7). Après 43 minutes, les courbes se sont toutefois légèrement éloignées l'une de l'autre. En revanche, après 60 minutes d'exposition, la

prise en charge du Mn en présence de 4 mM de chlorure n'était que de 36 % plus élevée que dans le milieu contenant une faible concentration de chlorure (comparativement à une différence de 300 % pour l'Ag).

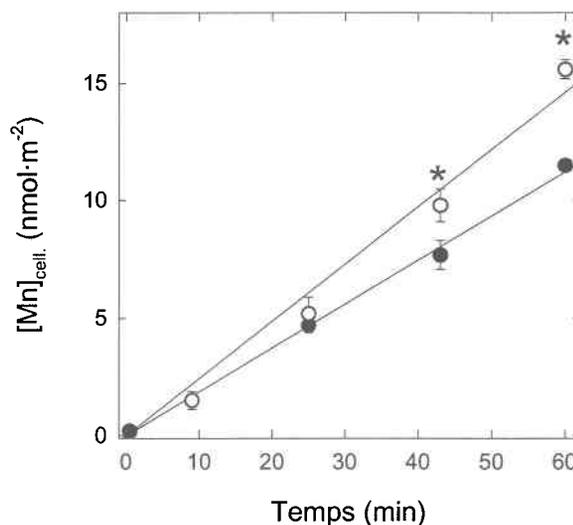


Figure 4.7 : Prise en charge du Mn dans le milieu MHSM-1 en fonction du temps. L'astérisque (*) indique une différence statistique significative entre les milieux de haute (○) et faible (●) concentrations en chlorure à $t \geq 43$ min (test de Student; $P < 0,05$).

4.3.3 Comparaison de l'accumulation d'Ag en présence de chlorure ou de thiosulfate

Afin de déterminer si la déviation du MIL observée était spécifique au chlorure ou encore le résultat d'un phénomène plus général, la prise en charge en présence de thiosulfate a été comparée à celle observée avec le chlorure comme ligand. Conformément aux expériences précédentes, la concentration d'Ag⁺ a été maintenue constante à 10 nM alors que les concentrations totales d'Ag et de ligand ont été augmentées. Dans le cas du chlorure, la prise en charge d'Ag a augmenté avec la concentration de chlorure (figure 4.8A), en opposition à ce que prédit le MIL. Une augmentation similaire a été observée pour le thiosulfate, mais l'augmentation semblait atteindre un plateau au-delà de ~ 75 nM Ag_T (figure 4.8B). Ce plateau a été reproduit à des concentrations plus élevées d'Ag (μ M; figure 4.8C).

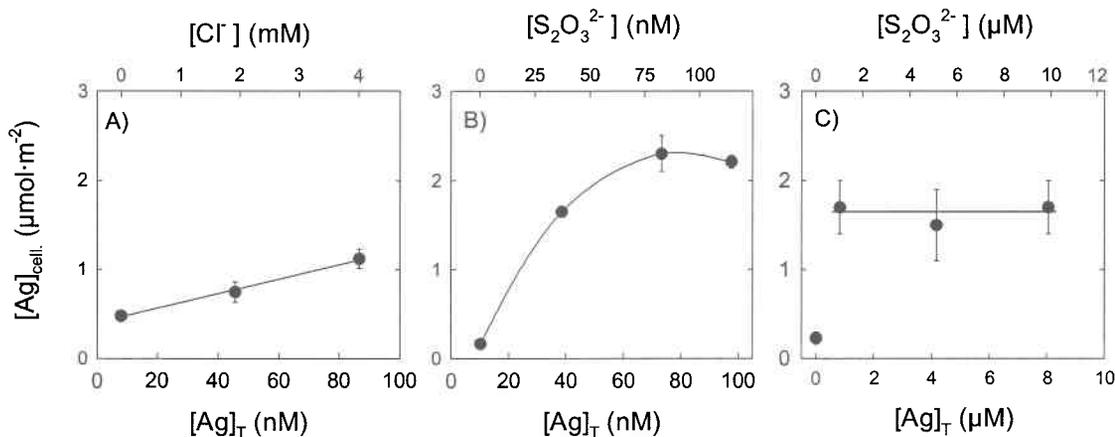


Figure 4.8 : Prise en charge de l'argent en fonction de la concentration de ligand. (A) Concentration de chlorure variable (5 μM à 4 mM), $t = 10$ min et $[Ag^+] = 8$ nM; (B) Concentration de thiosulfate variable (0 à 114 nM), $t = 12$ min et $[Ag^+] = 10$ nM; et (C) Concentration de thiosulfate variable (0 à 10 μM), $t = 12$ min et $[Ag^+] = 10$ nM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

4.4 Discussion

La comparaison de la prise en charge de l'Ag par *C. reinhardtii* dans des milieux dont la concentration en Ag^+ est identique mais celle en chlorure variable (figure 4.2A et B) démontre qu'il y a une accumulation accrue de l'Ag en présence de chloro-complexes. Afin de comprendre pourquoi le modèle de l'ion libre (MIL) ne s'applique pas à la prise en charge de l'Ag en présence d'une quantité appréciable de chloro-complexes d'argent, il est important de distinguer entre les différentes étapes pouvant limiter la prise en charge (Hudson, 1998; van Leeuwen, 1999).

4.4.1 Le transport transmembranaire comme étape limitante

Si k_{int} (internalisation; figure 4.4) est l'étape limitante, tel que présumé dans le développement initial du MIL, alors il existe un équilibre chimique entre l'Ag dans la solution d'exposition et l'Ag sur la surface algale. Dans de telles conditions d'équilibre, les phénomènes suivants pourraient expliquer la prise en charge accrue de l'Ag en présence de chlorure : a) un effet général du chlorure sur la perméabilité membranaire ou

sur la physiologie de l'algue; b) la diffusion passive du complexe AgCl^0 ; c) le transport accidentel de chloro-complexes chargés négativement par un transporteur d'anions.

4.4.1.1 *Effet du chlorure sur l'algue*

Un effet général du chlorure sur les processus de transport semble improbable, puisque la prise en charge à court terme du Mn, un cation ne formant pas de complexes avec le chlorure dans les conditions d'expérimentation, n'a pratiquement pas été affectée par les changements en concentration de chlorure (figure 4.7). Un effet spécifique, touchant un cation impliqué dans le transport du chlorure, pourrait toutefois jouer un rôle important. En effet, le système de transport du chlorure chez les algues serait un symport, utilisant l'ion H^+ lors du co-transport, ce système étant impliqué dans la régulation du pH interne (Raven, 1980). On a également rapporté dans la littérature qu'un couplage entre le K^+ et le Cl^- était possible (Raven, 1976). Si le transport du potassium pouvait être stimulé par une augmentation de la concentration en chlorure et si l'argent utilisait le système de transport du K^+ pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, on pourrait y associer le phénomène d'augmentation de la prise en charge de l'Ag à des concentrations élevées de chlorure. Toutefois, si un tel mécanisme était fonctionnel, il serait attendu que l'ajout d'un excès de potassium inhiberait la prise en charge de l'argent. En fait, tel que décrit plus tôt, la comparaison de résultats d'expériences réalisées avec une faible (4 mM) et une grande (100 mM) concentrations de potassium n'a démontré aucun effet compétitif de transport entre K^+ et Ag^+ (figures 3.6, 4.2A et B). Cet argument d'un effet physiologique du chlorure sur l'algue est donc rejeté.

4.4.1.2 *Diffusion passive du complexe AgCl^0*

Les conditions d'exposition choisies pour les expériences présentées dans les figures 4.2A et B ont été sélectionnées afin de maximiser la présence de l'espèce neutre AgCl^0 (~ 67 % de l' Ag_T). Il est donc tentant de suggérer que dans ces conditions, l'argent peut entrer à l'intérieur des cellules par, à la fois, un transport médié du cation Ag^+ (figure 4.4, k_{int} ; voir aussi chapitre 3) et par diffusion passive du monochloro-complexe (figure 4.4, k_3), et que cette dernière voie expliquerait l'accroissement de prise en charge de l'argent en

présence de concentrations de chlorure élevées. En effet, un tel mécanisme a été initialement suggéré par Engel *et al.* (1981) pour expliquer l'influence de la salinité sur la prise en charge de l'Ag par la crevette *Palaemonetes pugio*. McGeer et Wood (1998) ont évoqué le même argument pour expliquer une accumulation d'Ag dans les branchies de la truite arc-en-ciel supérieure dans les solutions contenant des concentrations de chlorure plus élevées. Il est à noter que, dans les deux cas, le mécanisme suggéré n'a cependant pas été testé. Très récemment, Reinfelder et Chang (1999) ont rapporté que les taux de prise en charge de l'Ag (total; sans distinction entre adsorption et absorption) chez la diatomée euryhaline *Thalassiosira weissflogii* étaient sensibles à la concentration ambiante de chlorure dans une gamme de pCl de 3,3 à 1,3 (0,5 à 50 mM). Ces auteurs ont conclu que l'espèce AgCl^0 « est la principale espèce biodisponible d'argent inorganique chez le phytoplancton ». Il s'agit là d'une interprétation attrayante, analogue au mouvement d'espèces neutres comme le HgCl_2^0 (Mason *et al.*, 1996) et le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ (diéthylthio-carbamate; Phinney et Bruland, 1994) à travers les membranes algales. Toutefois, trois facteurs arguent de façon persuasive en défaveur d'un tel mécanisme chez *C. reinhardtii* : (i) le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) pour l' AgCl^0 déterminé par Reinfelder et Chang (1999) est beaucoup plus faible que celui du HgCl_2^0 (Mason *et al.*, 1996), soit respectivement 0,09 et 3,3. En réalité, il n'y avait que peu de différence entre le K_{ow} d' Ag^+ (0,03) et celui d' AgCl^0 . (ii) La prise en charge accrue d'argent radioactif en présence de 4 mM de chlorure a été réduite de 66 % par l'ajout d'un excès d'Ag non radioactif (figure 4.6). Ce résultat n'est pas compatible avec ce qui aurait dû être observé en cas de diffusion passive de l' $^{110m}\text{AgCl}^0$. En effet, étant donné que la prise en charge de l'Ag en absence de chlorure implique un transport médié du cation Ag^+ , alors une compétition pour les sites de transport s'établira entre l' Ag^+ non radioactif ajouté et l' $^{110m}\text{Ag}^+$. En extrapolant la courbe de la figure 3.1B, l'ajout d'une concentration d'Ag non radioactif 20 fois supérieure à celle d' ^{110m}Ag devrait réduire la prise en charge de l' ^{110m}Ag par le même transporteur de 55 % (i.e., $0,35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ réduit à $0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$). Maintenant, si on considère l'augmentation de $0,34 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ (i.e. la différence observée entre les milieux A et B de la figure 4.6) et que cette hausse est causée par la diffusion du complexe neutre $^{110m}\text{AgCl}^0$, elle ne serait pas affectée par le complexe AgCl^0 non radioactif et entrerait dans la cellule indépendamment. En d'autres termes, pendant que le

transport médié de ^{110m}Ag serait réduit par l'Ag non radioactif, la diffusion passive de $^{110m}\text{AgCl}^{\circ}$ continuerait sans ambages. La prise en charge totale de ^{110m}Ag par les deux voies d'entrée serait donc de $0,34 + 0,16 = 0,50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. En réalité, la prise en charge de ^{110m}Ag dans le milieu C (figure 4.7) n'était que de $0,13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, moins du tiers de ce qui était anticipé sur la base d'un mécanisme de diffusion passive. (iii) La preuve la plus convaincante allant à l'encontre du modèle de diffusion passive provient des résultats de l'expérience à concentration fixe d' Ag_T (10 nM) avec concentrations variables de chlorure. Il a été démontré par cette expérience que malgré les changements majeurs dans les proportions relatives des espèces Ag^+ , AgCl° et AgCl_2^- se produisant à l'intérieur de la large gamme de concentrations de chlorure de $5 \mu\text{M}$ à 50 mM , la concentration d'Ag intracellulaire est demeurée presque stable en ne diminuant que légèrement (figure 4.3). Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Reinfelder et Chang (1999). Plusieurs différences peuvent toutefois être soulignées entre les deux études : les espèces d'algues choisies (chlorophycée vs diatomée); les concentrations d' Ag_T (10 nM vs 50 pM); la méthodologie (Ag intracellulaire vs total, i.e. adsorbé + intracellulaire); et le temps d'exposition (15 min vs 4 h). De plus, il est à noter que les taux de prise en charge de l'Ag normalisés selon la concentration d'exposition sont 40 X supérieurs chez *C. reinhardtii* que chez *T. weissflogii* (respectivement de $0,18$ et $0,044 \mu\text{mol Ag}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{nM}^{-1}$ Ag).

4.4.1.3 *Transport accidentel par un transporteur anionique*

Le paradigme courant pour la prise en charge des métaux par les algues est basé sur la notion de transport médié des cations métalliques et, dans certains cas, de transport de complexes neutres et lipophiles par diffusion passive. Toutefois, la prise en charge de complexes chargés négativement a déjà été évoquée chez les algues (Cd-citrate; Errécalde *et al.*, 1998; Errécalde et Campbell, 2000). Malgré qu'aucun cas impliquant des anions inorganiques n'ait été recensé, les systèmes de transport d'anions sont réputés être peu sélectifs (Stein, 1990). La possibilité que le complexe intact d' AgCl_2^- soit transporté à l'intérieur de la cellule en trompant le transporteur de chlorure a été examinée. Il est à souligner que la prise en charge d'un tel complexe hydrophile impliquerait nécessairement un transport médié par l'algue et que cette explication serait donc compatible avec les résultats présentés à la figure 4.6 puisque l'ajout d'un excès d'Ag non

radioactif inhiberait probablement la prise en charge de l' ^{110m}Ag par cette voie d'entrée. Toutefois, le taux mesuré de prise en charge du chlorure chez *C. reinhardtii* ne semble pas suffisamment élevé pour justifier la différence d'accumulation d'argent observée entre les milieux de faible et de haute concentrations en chlorure. La prise en charge à court terme du chlorure par *C. reinhardtii*, mesurée à l'aide de l'isotope ^{36}Cl , était de $0,055 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ pour une concentration externe de chlorure de $10,4 \mu\text{M}$ (voir annexe C sur le transport du ^{36}Cl). En supposant que la prise en charge du chlorure augmente de façon linéaire avec la concentration de chlorure en solution (tout en sachant que ce n'est probablement pas le cas, ceci permet d'estimer un taux de prise en charge maximal optimiste pour fin de comparaison), il est possible de calculer un taux de prise en charge à 4 mM Cl^- de $21 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ (cf. des flux allant jusqu'à $3,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ont été rapportés pour des algues d'eau douce exposées à 1 mM Cl^- ; Raven, 1976). En présumant que l'augmentation de l'accumulation d'Ag à 4 mM Cl^- est attribuable à la prise en charge des complexes AgCl_x^{1-x} et en considérant que ces complexes entreront en compétition avec le Cl^- pour les sites de transport, on peut calculer le flux nécessaire du transporteur pour obtenir la concentration d' AgCl_x^{1-x} transportée. Ces complexes totalisent une concentration de 90 nM dans les milieux contenant 4 mM de chlorure, un facteur de dilution de plus de $44\,000$. Ainsi, pour une différence de prise en charge normalisée pour le temps entre les milieux avec et sans chlorure de $120 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$, et en supposant que le complexe AgCl_2^- entre à la même vitesse que l'ion chlorure, il faudrait un flux de plus de $5\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ de chlorure pour atteindre ce niveau d'accumulation d' AgCl_x^{1-x} (cf. un taux maximal calculé de $21 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). Il est donc très improbable qu'un système de transport de chlorure soit impliqué dans la prise en charge de l'argent.

4.4.2 La diffusion à travers la couche non-mélangée comme étape limitante

Jusqu'à maintenant, il a été présumé que l'étape limitante dans la prise en charge de l'Ag était le mouvement du métal à travers la membrane plasmique de l'algue (i.e., $k_{\text{int}} < k_{-1}$ dans la figure 4.4; prémisse du MIL). Dans un tel cas, l'Ag présent à la surface de l'algue est en équilibre avec l'Ag présent en solution. La possibilité que l'internalisation de l'Ag soit rapide et qu'une autre étape limite la prise en charge est maintenant envisageable.

Étant donné le faible rapport {charge : rayon} de l'Ag (0,87) et la constante de vitesse élevée de perte d'une molécule d'eau de la sphère d'hydratation qui en résulte ($[\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_n^+ \sim \text{X}]_{\text{os}} \xrightarrow{k_{-w}} [\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_{n-1}\text{X}]_{\text{is}} + \text{H}_2\text{O}$; $k_{-w} \approx 10^{12} \text{ s}^{-1}$), l'Ag⁺ devrait manifester une cinétique de complexation très rapide (cf. Morel et Hering, 1993; figure 6.21). Il est donc peu probable que la cinétique de formation des complexes à la surface soit l'étape limitante. En effet, l'expérience « pulse-chase » a démontré moins de 15 % d'augmentation d'^{110m}Ag_{cell.} chez les algues récoltées et resuspendues dans un milieu frais ne contenant que de l'Ag non radioactif (figure 4.5, courbe D), indiquant que k_1 ou $k_2 \geq k_{\text{int}}$ (figure 4.4). Toutefois, le déplacement physique du métal jusqu'à la cellule (i.e. la diffusion à travers la couche non-mélangée entourant la cellule) pourrait être limitante, tel qu'argumenté récemment par Hudson (1998) et par van Leeuwen (1999). Cette option a d'ailleurs déjà été considérée comme facteur susceptible de limiter la vitesse de prise en charge du Fe (Jackson et Morgan, 1978) et de nutriments (Nissen, 1974; Pasciak et Gavis, 1974; Ploug et al., 1999a, b; Sanford et Crawford, 2000). Compte tenu des taux de prise en charge de l'Ag exceptionnellement élevés (de plusieurs ordres de grandeur supérieurs à ce qui a été mesuré pour le Cd et le Mn avec la même algue), la possibilité que la diffusion de l'Ag et de ses chloro-complexes à travers la couche non-mélangée affecte le taux de prise en charge de l'Ag a été examinée.

Si la diffusion de l'Ag à travers la phycosphère était l'étape limitante dans la prise en charge de l'Ag, alors l'accumulation d'Ag serait proportionnelle à la concentration des espèces d'Ag diffusant vers la surface plutôt qu'à la concentration d'Ag⁺ (Tessier *et al.*, 1994). Justement, de tels résultats ont été obtenus dans l'expérience où Ag_T est demeuré constant alors que la concentration de chlorure passait de 5 µM à 50 mM (figure 4.3, [Ag]_T = 10 nM, pCl 5.3 à 1.3). Malgré des changements radicaux dans la spéciation de l'Ag dans cette gamme de concentrations de chlorure, la prise en charge n'a diminué que de 20 à 35 %. Ces résultats démontrent clairement que dans des conditions d'exposition normales ([Ag]_T < 10 nM; densité cellulaire de 10,000 cell. • mL⁻¹), la prise en charge de l'Ag est mieux reliée à la concentration totale qu'à la concentration d'une espèce individuelle d'Ag. À une concentration plus élevée d'Ag (115 nM) dans la même gamme

de concentrations de chlorure, la diminution était plus considérable, atteignant presque 50 % (figure 4.3; pentes significativement différentes, ANCOVA : $P < 0,005$), mais de nouveau elle était nettement moins grande que la baisse en Ag^+ .

Si la prise en charge de l'Ag était contrôlée par la diffusion de la solution mélangée vers la surface cellulaire, on pouvait s'attendre à ce qu'il y ait un seuil de concentration au-delà duquel la prise en charge n'était plus limitée par la diffusion à travers la couche non-mélangée et redevenait proportionnelle à la concentration d' Ag^+ . Ce seuil apparaîtrait graduellement, au moment où les sites de transport deviennent partiellement saturés, engendrant un régime transitoire où la prise en charge ne serait proportionnelle ni à la concentration d' Ag_T , ni à celle d' Ag^+ . De plus, cette accumulation limitée par la diffusion ne devrait pas être réservée au chlorure mais devrait plutôt s'appliquer à n'importe quel ligand en solution. Pour vérifier ce point, le thiosulfate a été utilisé comme ligand afin de comparer les résultats obtenus avec le chlorure et en augmentant la gamme de concentrations d'Ag (figure 4.8). Dans ces expériences, la concentration d' Ag^+ a été maintenue constante à 10 nM dans tous les milieux en augmentant de façon concomitante les concentrations d' Ag_T et de ligand. La prise en charge d'Ag a augmenté en fonction de la concentration d' Ag_T jusqu'à environ 75 nM pour ensuite se stabiliser (figure 4.8B). À des concentrations beaucoup plus élevées, de l'ordre du μM , et en maintenant toujours Ag^+ à 10 nM, la prise en charge de l'Ag est devenue indépendante de l' Ag_T (figure 4.8C). Ces observations supportent l'idée que la diffusion à travers la couche non-mélangée entourant l'algue est limitante à de faibles concentrations d' Ag_T . Signalons toutefois que les niveaux de prise en charge avec le thiosulfate étaient supérieurs à ceux obtenus avec le chlorure, suggérant que le complexe $\text{AgS}_2\text{O}_3^{-1}$ pénètre à l'intérieur de l'algue. Le chapitre suivant est consacré à l'étude de cette possibilité.

Afin de vérifier si une diffusion limitante de l'Ag à travers la phycosphère est plausible, il est possible de calculer un flux théorique de l'Ag dans cette couche non-mélangée. L'équation décrivant la diffusion d'un ion à travers un plan de cisaillement (J_{Ag} , exprimé en $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $1 \text{ pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) a été dérivée par Crank (1956) :

$$J = \frac{4\pi D \left(\frac{r_c r_d}{r_d - r_c} \right) (C_b - C_s)}{A} \quad (4.1)$$

où r_c représente le rayon de la cellule (2×10^{-4} cm); r_d , le rayon de la cellule plus l'épaisseur de la zone non-mélangée (estimée à 8×10^{-4} cm, selon Whitfield et Turner (1979); donc $r_d = 1 \times 10^{-3}$ cm); D , le coefficient de diffusion d'Ag⁺ ($10^{-4.81}$ cm²•s⁻¹; Li et Gregory, 1974; Kariuki et Dewald, 1996); A , la surface algale (cm²); et finalement, C_b et C_s , respectivement les concentrations d'Ag dans la solution externe (8 pmol•cm⁻³) et à la surface (≈ 0 pmol•cm⁻³). Le flux diffusiel maximal calculé dans ces conditions serait de 0,8 pmol•cm⁻²•s⁻¹, alors que les flux mesurés sont de 0,08 pmol•cm⁻²•s⁻¹. Pour démontrer de façon non ambiguë que la diffusion à travers la couche non-mélangée est limitante dans la prise en charge de l'Ag, les taux d'internalisation observés devraient approcher le taux maximal théorique. Dans le cas présent, le flux mesuré représente environ 10 % du flux maximal calculé. Compte tenu de la similarité relative des flux calculé et mesuré ainsi que de l'incertitude inhérente à de tels calculs (Whitfield et Turner, 1979), la conclusion d'une limitation (au moins partielle) de la prise en charge de l'Ag par la diffusion du métal à travers la zone non-mélangée est une explication rationnelle aux résultats présentés dans ce chapitre (voir aussi annexe E).

4.5 Conclusion

Ces expériences ont d'abord démontré que sous certaines conditions la prise en charge de l'Ag chez *C. reinhardtii* peut se soustraire à l'applicabilité du MIL. De plus, cette déviation du MIL n'est pas le résultat de la diffusion passive de l'espèce neutre AgCl⁰, tel que suggéré à quelques reprises dans la littérature, mais reflète plutôt un contrôle diffusif de la prise en charge de l'Ag (van Leeuwen, 1999). De par son taux d'internalisation élevé, l'accumulation d'argent ne respecte pas les prédictions du MIL à des concentrations inférieures à $\sim 10^{-7}$ M, jusqu'à ce que le flux diffusif de l'Ag à travers la couche non-mélangée séparant l'algue de son environnement excède le flux d'Ag à travers la membrane plasmique. Au-delà de cette concentration seuil, l'effet diffusif se

dissipe et la prise en charge de l'Ag semble de moins en moins reliée à la concentration totale d'Ag (i.e., de plus en plus influencée par la spéciation de l'argent dissous).

Puisque la plupart des expériences de prise en charge sont effectuées en laboratoire en utilisant des ligands pour tamponner la concentration de métal en solution, la concentration totale de métal est donc habituellement beaucoup plus élevée que celle de métal libre. Une telle approche peut éclipser les cas de prises en charge contrôlées par la diffusion à travers la couche non-mélangée en maintenant un flux diffusif très élevé (le flux étant proportionnel au gradient de concentration). En milieu naturel, plusieurs métaux (Cd et Zn par exemple) ne sont pas bien tamponnés. L'utilisation de ligands synthétiques tels que l'EDTA et le NTA (acide nitrilotriacétique) comme tampons à métaux peut ainsi masquer l'influence de potentiels processus de diffusion et de dissociation à la surface des membranes biologiques.

4.5.1 Répercussions environnementales

Les concentrations naturelles d'Ag se retrouvent bien en-deçà de 10^{-7} M, la concentration seuil estimée chez *C. reinhardtii* à partir de laquelle l'accumulation n'est plus proportionnelle à la concentration totale. Ceci suggère que la prise en charge d'Ag dans l'environnement serait toujours sous contrôle diffusif. Toutefois, on ignore si ces découvertes s'appliquent à d'autres espèces d'algues ou même à d'autres organismes aquatiques. Si la limitation de la prise en charge de l'Ag par la diffusion dans la couche non-mélangée se révélait être un phénomène général s'appliquant aux autres espèces aquatiques dans des conditions naturelles, alors il pourrait s'agir d'un argument important en faveur d'un critère de qualité de l'eau basé sur la concentration totale d'argent dissous.

5. EFFET DU THIOSULFATE

5.1 Introduction

Une des prémisses du modèle de l'ion libre (MIL) est que seul le métal cationique est transporté à l'intérieur de la cellule. En d'autres termes, il peut y avoir formation de complexes ternaires, $ML-X \rightleftharpoons \text{cellule}$, mais ces complexes mixtes : i) ne provoquent pas d'effet toxique; et ii) ne donnent pas lieu au transport membranaire du complexe ML (Morel, 1983; Campbell, 1995). En principe, l'absorption de complexes métal-ligand intacts pourrait se produire avec des ligands inorganiques assimilables tels que le phosphate et le sulfate, à condition que ces complexes se forment dans les conditions naturelles. Il existe, aux interfaces biologiques, des systèmes de transport pour ces nutriments anioniques; si ces transporteurs pouvaient être bernés en liant et en transportant à l'intérieur des cellules un complexe métal-anion intact, alors, il y aurait un transport "accidentel" du métal par voie anionique (Campbell, 1995). Pour la plupart des métaux, la formation de complexes aqueux avec le phosphate et le sulfate n'est pas favorable thermodynamiquement. En eaux douces, à des concentrations de métaux et d'anions réalistes d'un point de vue environnemental, ces complexes sont présents à des niveaux si faibles qu'on ne peut leur attribuer un rôle significatif dans le transport accidentel. En revanche, si le métal et le ligand inorganique assimilable devaient former un complexe stable, cet argument thermodynamique ne s'appliquerait plus.

L'argent forme une série de complexes hydrophiles et très stables avec le thiosulfate ($AgS_2O_3^-$, $Ag(S_2O_3)_2^{3-}$: $\log K_1 = 8,82$, $\log \beta_2 = 13,50$; Martell *et al.*, 1998). Le thiosulfate est présent à concentrations significatives dans les eaux interstitielles de sédiments (Luther *et al.*, 1986a, b), dans les eaux de drainage minier acide (Druschel *et al.*, 1999) et dans les rejets de l'industrie photographique (Purcell et Peters, 1998). La complexation de l'Ag par le thiosulfate réduira les concentrations d' Ag^+ et, selon le MIL, réduira d'autant la biodisponibilité de l'argent. Toutefois, des résultats opposés ont été rapportés pour l'accumulation de l'Ag par la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, lors d'expériences d'expositions en laboratoire (Janes et Playle 1995; Hogstrand *et al.*, 1996; Wood *et al.*,

1996b). Aucun de ces chercheurs n'a cependant été en mesure d'offrir une explication plausible à ces observations sauf en suggérant que le complexe AgS_2O_3^- était, d'une quelconque façon, « biodisponible ».

Dans ce chapitre, l'hypothèse que l'argent puisse traverser la membrane plasmique sous la forme du complexe argent-thiosulfate, via un transporteur anionique, a été testée. Ce transport accidentel se ferait par mimique moléculaire (Clarkson, 1993) par un système de transport du sulfate. Puisque les algues vertes possèdent de tels systèmes de transport transmembranaire pour l'assimilation du sulfate (Hodson *et al.*, 1968; Monheimer, 1981; Perez-Castiñeira *et al.*, 1998), elles devraient constituer un bon modèle biologique pour tester l'hypothèse selon laquelle le thiosulfate et le complexe argent-thiosulfate peuvent utiliser la même voie d'entrée que le sulfate vers l'intérieur des cellules.

5.2 Méthodologie expérimentale

Un total de quatre expériences ont été réalisées. Dans la première, la cinétique d'accumulation à 0, 23, 45 et 60 minutes a été déterminée dans trois milieux d'exposition (tableau 5.1; milieux A, B et C). Les concentrations nominales d'Ag total et libre étaient identiques pour chaque milieu, soit respectivement de 104 et 10 nM. Les milieux A et B contenaient tous deux 114 nM de thiosulfate, et possédaient donc une spéciation identique de l'Ag. Toutefois, le milieu A ne contenait pas de sulfate (MgSO_4 substitué par du $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Finalement, le milieu C contenait suffisamment de chlorure pour complexer l'Ag au niveau désiré (4 mM KCl; la quantité de KNO_3 de ce milieu a été réduite afin de conserver la force ionique constante; voir tableau 5.1). Notons que ces expériences se sont déroulées à des concentrations supérieures au seuil diffusif identifié à la section 4.4.2.

Dans la seconde expérience, la prise en charge après 15 minutes d'exposition a été mesurée en fonction de la concentration de sulfate en présence de chlorure ou de thiosulfate. Ici aussi, les concentrations totales et libres d'Ag ont été maintenues constantes respectivement à 104 et à 10 nM dans chaque milieu. Six concentrations de sulfate ont été testées en présence de thiosulfate (milieu E : 0, 40, 80, 120, 160 et 200 μM

SO₄) alors que seulement la plus faible et la plus élevée des concentrations de sulfate ont été testées en présence de chlorure (milieu F : 0 et 200 µM SO₄).

Tableau 5.1: Conditions d'exposition à l'argent pour chaque expérience.

| Expérience | Milieu | [Ag] _T (nM) | [Ag ⁺] (nM) | [Cl ⁻] (mM) | [NO ₃ ⁻] (mM) | [SO ₄ ²⁻] (µM) | [S ₂ O ₃ ²⁻] (µM) |
|------------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---|--|--|
| 1 | A | 104 | 10 | 0,05 | 5,23 | 0,0 | 0,114 |
| | B | 104 | 10 | 0,05 | 5,07 | 81,0 | 0,114 |
| | C | 104 | 10 | 4,0 | 1,07 | 81,0 | 0,0 |
| | D ¹ | 10 | 10 | 0,05 | 5,07 | 81,0 | 0,0 |
| 2 | E | 104 | 10 | 0,05 | 5,23 | 0 – 200 | 0,114 |
| | F | 104 | 10 | 4,0 | 1,07 | 0 / 200 | 0,0 |
| 3 | G | 104 | 10 | 0,05 | 5,23 | 0,0 | 0,114 |
| | H | 104 | 104 | 0,05 | 5,23 | 0,0 | 0,0 |
| | I | 104 | 10 | 0,05 | 5,23 | 120 | 0,114 |
| | J | 104 | 10 | 4,0 | 1,23 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | K | 104 | 10 ⁻⁴ – 10 | 0,05 | 5,07 | 81,0 | 0,114 – 114 |

¹ Données provenant de la figure 3.6.

Dans la troisième expérience, la prise en charge (15 min) en absence de ligands (milieu H) a été mesurée et comparée à celle obtenue dans trois milieux contrastants : (J) 4 mM Cl, 0 µM SO₄; (G) 114 nM S₂O₃, 0 µM SO₄; et (I) 114 nM S₂O₃, 120 µM SO₄. La concentration totale d'Ag était de 104 nM dans tous les milieux alors que la concentration d'Ag⁺ était de 10 nM dans les milieux où un ligand était présent. Le milieu H ne contenant ni chlorure, ni thiosulfate, il possédait une concentration d'Ag libre égale à sa concentration totale (104 nM).

Dans la dernière expérience (milieu K), la prise en charge (15 min) de l'Ag en présence de thiosulfate (0,114, 1,14, 11,4 et 114 µM) a été mesurée, alors que la concentration

d'argent totale était constante à 104 nM dans tous les milieux. La concentration d'Ag⁺ diminuait donc avec la quantité de thiosulfate ajoutée.

5.3 Résultats

La prise en charge de l'argent par *Chlamydomonas reinhardtii* était fortement affectée par la nature des anions présents dans le milieu d'exposition (figure 5.1), et ce même si les concentrations en Ag⁺ étaient constantes à 10 nM dans chaque milieu. L'accumulation d'Ag après 25 minutes augmentait dans l'ordre suivant : 1 (NO₃⁻; données provenant de la figure 3.6) < 2.2 (Cl⁻) < 5 (S₂O₃²⁻, 81 μM sulfate) < 14 (S₂O₃²⁻, absence de sulfate).

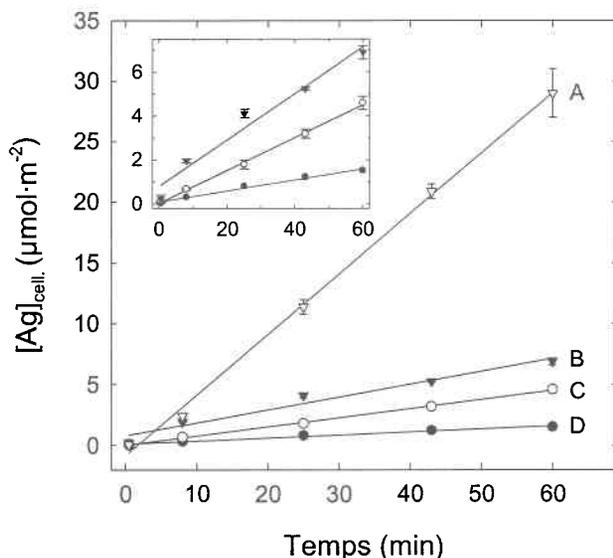


Figure 5.1: Prise en charge de l'argent en fonction du temps à une concentration d'Ag⁺ constante (10 nM). (A) Prise en charge à faible concentration de chlorure en présence de thiosulfate mais en absence de sulfate. (B) Prise en charge à faible concentration de chlorure en présence de thiosulfate et de sulfate. (C) Prise en charge à haute concentration de chlorure en absence de thiosulfate. (D) Prise en charge à faible concentration de chlorure en absence de thiosulfate (données provenant de la figure 3.6). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. L'inséré représente les courbes de cinétique d'accumulation B, C et D sur une échelle plus petite.

Une diminution de la concentration habituelle en sulfate (81 μM → 0 μM) a provoqué une augmentation importante de la prise en charge de l'Ag en présence de thiosulfate.

L'effet compétitif du sulfate augmentait jusqu'à ce que le sulfate atteigne une concentration de 100 μM , après laquelle l'accumulation d'Ag devenait apparemment stable (figure 5.2). La présence ou l'absence de sulfate dans le milieu d'exposition n'a toutefois pas eu d'effet sur la prise en charge de l'Ag lorsque le chlorure était utilisé comme ligand (test de Student : $P < 0,05$). La prise en charge de l'Ag en présence de thiosulfate est demeurée supérieure à celle observée en présence de chlorure et ce même aux concentrations élevées de sulfate (figure 5.2; comparer les points à l'extrémité droite de la figure).

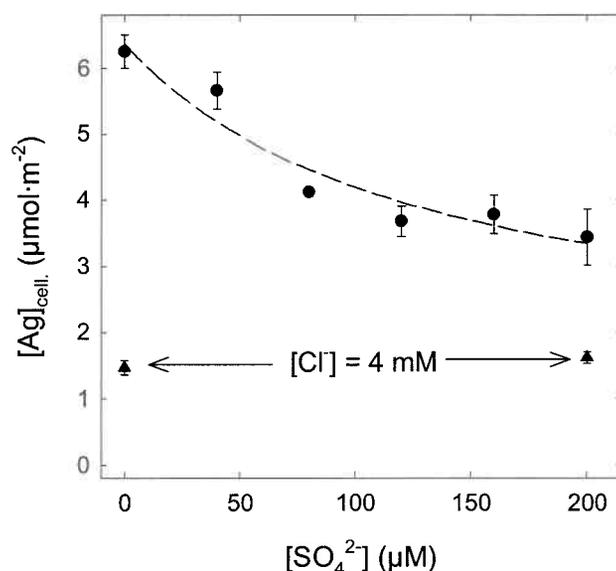


Figure 5.2 : Effet de la concentration ambiante de sulfate dans le milieu d'exposition sur la prise en charge de l'argent à concentrations d' Ag^+ et d' Ag_T constantes en présence de thiosulfate (●) ou de chlorure (▲) comme ligand (milieux E et F). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Dans la troisième expérience (milieux G, H, I et J), la prise en charge de l'Ag en présence de chlorure (4 mM) était environ deux fois inférieure à celle mesurée dans le milieu sans ligand (0,53; figure 5.3, colonne J + colonne H), ce qui est cohérent avec l'effet protecteur anticipé de la complexation de l'Ag par le chlorure. L'accumulation d'Ag dans le milieu contenant à la fois du thiosulfate et du sulfate était inférieure à celle du milieu non complexant mais seulement par très peu (0,85; figure 5.3, colonne I + colonne H; test

de Student : $P < 0,05$). À l'opposé, cette différence s'accroît grandement (0,44; figure 5.3, colonne I ÷ colonne G) par rapport au milieu avec thiosulfate mais sans sulfate, tel qu'observé préalablement aux figures 5.1 et 5.2. Encore plus remarquable est l'accumulation d'Ag dans le milieu G, contenant du thiosulfate mais en absence de sulfate, qui était environ deux fois supérieure à la prise en charge dans le milieu H, non complexant (1,9; figure 5.3, colonne G ÷ colonne H); ceci révèle une véritable stimulation de la prise en charge de l'Ag dans le milieu G, dont la concentration d'Ag⁺ était pourtant dix fois inférieure à celle du milieu H.

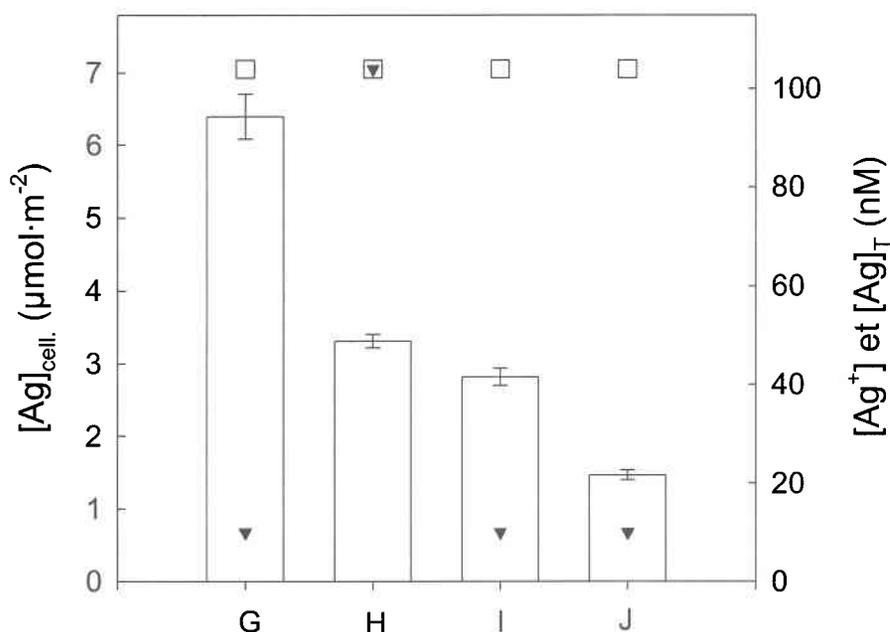


Figure 5.3 : Comparaison de la prise en charge d'Ag de quatre milieux expérimentaux contrastants après 15 minutes d'exposition à 10 ou 104 nM Ag⁺ (▼) et 104 nM Ag_T (□). (G) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en présence de thiosulfate (114 nM) mais en absence de sulfate. (H) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en absence de thiosulfate et de sulfate (milieu sans complexation, utilisé pour fins de comparaison). (I) Prise en charge à faible concentration de chlorure (5 μM) en présence de thiosulfate (114 nM) et de sulfate (120 μM). (J) Prise en charge à haute concentration de chlorure (4 mM) en absence de thiosulfate et de sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Dans la quatrième et dernière expérience, la prise en charge de l'Ag à une concentration fixe d'Ag_T a diminué avec l'accroissement de la concentration en thiosulfate. Aucune relation linéaire n'a été décelée avec les différents paramètres. L'accumulation d'argent augmente rapidement en fonction de la concentration d'argent libre, mais ce de façon logarithmique (figure 5.4).

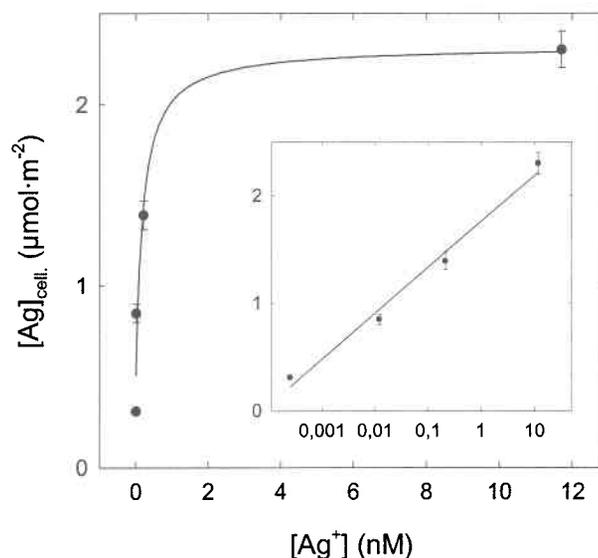


Figure 5.4 : Prise en charge de l'argent en fonction de la concentration d'Ag⁺ lorsque Ag_T est constant mais thiosulfate variable (sur une échelle logarithmique en médaillon). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

5.4 Discussion

5.4.1 Stimulation de la prise en charge de l'Ag par le thiosulfate chez *C. reinhardtii*

Lors d'expériences précédentes (chapitre 4), il a été démontré que la prise en charge de l'Ag en présence de chlorure chez *C. reinhardtii* était plus élevée que ce que prédit le MIL. En effet, pour une concentration fixe d'Ag⁺ (10 nM), la prise en charge de l'Ag augmente sensiblement lorsque la concentration de chlorure passe de 5 μM à 4 mM (figure 5.1, voir médaillon, comparer les courbes C et D). Cette différence entre les deux courbes s'explique par la très haute vitesse de transport de l'Ag chez *C. reinhardtii*, qui mène à une diffusion partiellement limitante des espèces d'Ag dans la couche non-

mélangée qui sépare la cellule de la solution externe et qui donne ainsi une accumulation proportionnelle à la concentration totale d'Ag en solution (i.e. au gradient de concentration entre la solution externe et la surface des cellules).

Une différence similaire mais encore plus grande a également été observée dans la prise en charge de l'Ag en présence de thiosulfate (figure 5.1, comparer les courbes A et B avec la courbe C). Dans ce cas, toutefois, on ne peut évoquer d'écart entre les concentrations totales pour expliquer les dissimilitudes entre les courbes A et B puisque, à la fois, les concentrations totale et libre étaient égales dans les trois milieux (respectivement 104 et 10 nM – voir tableau 5.1). Ces résultats démontrent plutôt que (i) le complexe AgS_2O_3^- est transporté à travers la membrane plasmique via un transporteur de sulfate et de thiosulfate causant une stimulation dans la prise en charge de l'Ag en présence de thiosulfate et que (ii) ce mécanisme de transport membranaire est affecté par les concentrations externes de sulfate.

Plusieurs publications scientifiques indiquent que les micro-organismes partagent un même système de transport membranaire pour le sulfate et le thiosulfate (bactéries : Dreyfuss, 1964; Stahlmann *et al.*, 1991; Sirko *et al.*, 1995; algues : Hodson *et al.*, 1968; Vallée et Jeanjean, 1968a; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Un effet compétitif entre le sulfate et le thiosulfate a d'ailleurs été observé lors d'expériences de prise en charge du sulfate par des algues vertes unicellulaires (Vallée et Jeanjean, 1968a; Biedlingmaier et Schmidt, 1989; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998), le thiosulfate étant un inhibiteur compétitif efficace du transport de sulfate (voir annexe D). De plus, des études ont démontré que plusieurs espèces d'algues peuvent croître avec du thiosulfate comme seule source de soufre (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998) et que le thiosulfate peut être assimilé par *Chlorella pyrenoidosa* tout aussi efficacement que le sulfate (Hodson *et al.*, 1968). Récemment, Prieto *et al.* (1997) ont identifié chez *C. reinhardtii* une enzyme constitutive permettant la réduction du thiosulfate, ce qui confirme la présence de mécanismes dédiés au métabolisme du thiosulfate.

Sachant que le sulfate et le thiosulfate peuvent partager un même système de transport et que le milieu d'exposition B (tableau 5.1) contient beaucoup plus de sulfate (81 μM) que de thiosulfate (0,114 μM), un milieu sans sulfate a été préparé (milieu A). L'absence de sulfate (courbe A; figure 5.1) a mené à une augmentation de la prise en charge de plus de six fois supérieure à celle obtenue lors de l'exposition au chlorure (courbe C; figure 5.1). Ces résultats révèlent la présence d'un autre mécanisme pour lequel le sulfate a un impact important. Une addition progressive de sulfate en présence de thiosulfate a permis d'observer une diminution graduelle de la prise en charge d'Ag (figure 5.2). Notons toutefois que la concentration de sulfate présente dans le milieu d'exposition contenant du chlorure comme ligand n'avait pas d'effet significatif sur la prise en charge de l'Ag (test de Student; $P = 0,152$). Ainsi, l'effet du sulfate est de nature compétitive, indiquant une interaction entre les complexes AgS_2O_3^- et le SO_4^{2-} . Ces résultats supportent clairement l'hypothèse d'un transport de l'Ag (lorsqu'en présence de thiosulfate) via un transporteur de sulfate / thiosulfate. Par ailleurs, l'ajout progressif de sulfate n'a pas permis d'atteindre les niveaux de prise en charge d'Ag observés en présence de chlorure. Également, la prise en charge ne semblait plus altérée au-delà de 100 μM de SO_4^{2-} .

Si les interactions $\text{AgS}_2\text{O}_3^- / \text{SO}_4^{2-}$ avec un site de transport $\equiv\text{Y}$ sont réellement de nature compétitive, alors il est possible de dériver un modèle décrivant cette compétition. En présumant que le site $\equiv\text{Y}$ est à l'équilibre avec les différentes espèces présentes, on peut décrire ces équilibres de la façon suivante :

$$\{\equiv\text{Y} - \text{AgS}_2\text{O}_3\} = K_1 \cdot \{\equiv\text{Y}\} \cdot [\text{AgS}_2\text{O}_3^-] \quad (5.1)$$

$$\{\equiv\text{Y} - \text{SO}_4\} = K_2 \cdot \{\equiv\text{Y}\} \cdot [\text{SO}_4^{2-}] \quad (5.2)$$

où K est une constante d'équilibre. De plus, le nombre total de sites Y_T peut être décrit par l'équation suivante :

$$Y_T = \{\equiv\text{Y}\} + \{\equiv\text{Y} - \text{SO}_4\} + \{\equiv\text{Y} - \text{S}_2\text{O}_3\} + \{\equiv\text{Y} - \text{AgS}_2\text{O}_3\} \quad (5.3)$$

En supposant que la quantité de sites occupés par le thiosulfate et le complexe AgS_2O_3^- soit négligeable par rapport aux sites libres et occupés par le sulfate et en combinant les équations 5.1 à 5.3, on obtient la relation suivante :

$$\{ \equiv Y - AgS_2O_3 \} = \frac{Y_T \cdot K_1 \cdot [AgS_2O_3^-]}{(1 + K_2 \cdot [SO_4^{2-}])} \quad (5.4)$$

Finalement, si la prise en charge de l'Ag se fait par deux sites de transport, un premier pour l'Ag⁺ ($\equiv X$) et un deuxième pour le complexe AgS₂O₃⁻ ($\equiv Y$), cette internalisation peut être exprimée par :

$$\varphi_{Ag\ cell.} = k_1 \cdot \{X \equiv Ag\} + k_2 \cdot \{Y \equiv AgS_2O_3\} \quad (5.5)$$

Le site $\equiv X$ étant en équilibre avec l'ion Ag⁺, on peut combiner les équations 5.4 et 5.5 et regrouper les éléments constants de ces équations (α et β), pour obtenir un modèle de transport à deux sites décrivant les résultats de la figure 5.2 :

$$\varphi_{Ag\ cell.} = \alpha \cdot [Ag^+] + \frac{\beta \cdot [AgS_2O_3^-]}{1 + K_2 \cdot [SO_4^{2-}]} \quad (5.6)$$

Dans cette équation, le flux intracellulaire d'Ag (φ : $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) est exprimé par l'addition de deux termes représentant les deux systèmes de transport de l'Ag en présence de thiosulfate. Le premier de ces deux termes dépend de la concentration d'Ag⁺ alors que le second est proportionnel à la concentration du complexe AgS₂O₃⁻ (en mol·L⁻¹). Ce second terme est également sujet à une compétition de la part du sulfate (en mol·L⁻¹) selon une constante d'affinité K₂ avec le site de transport partagé par les deux ions. En appliquant cette équation aux résultats de la figure 5.2, on peut déterminer la valeur des termes constants : $\alpha = 10^{6,96}$; $\beta = 10^{6,55}$; $K_2 = 10^{3,89}$ (figure 5.2; r² = 0,89). À partir de cette équation, en extrapolant à une concentration infiniment grande de sulfate, on obtient un niveau de prise en charge égal à celui observé dans les milieux contenant 4 mM de chlorure.

Le sulfate a un effet sur la prise en charge de l'argent seulement si le thiosulfate est présent, puisque la prise en charge de l'argent en présence de 4 mM de Cl⁻ n'est pas affectée par la présence ou l'absence de sulfate (figure 5.2). En absence de thiosulfate, seul un système de transport cationique (présumément dédié au Cu(I); voir chapitre 3) permet à l'Ag d'entrer à l'intérieur de l'algue *C. reinhardtii* et ce transporteur est insensible aux concentrations environnantes de sulfate. Toutefois, dans les milieux A et B

(figure 5.1), une deuxième voie d'entrée parallèle pour l'Ag est introduite, et cette voie implique le transport accidentel de complexes argent-thiosulfate via un système de transport conçu pour le sulfate et le thiosulfate. Ce modèle conceptuel est illustré à la figure 5.5.

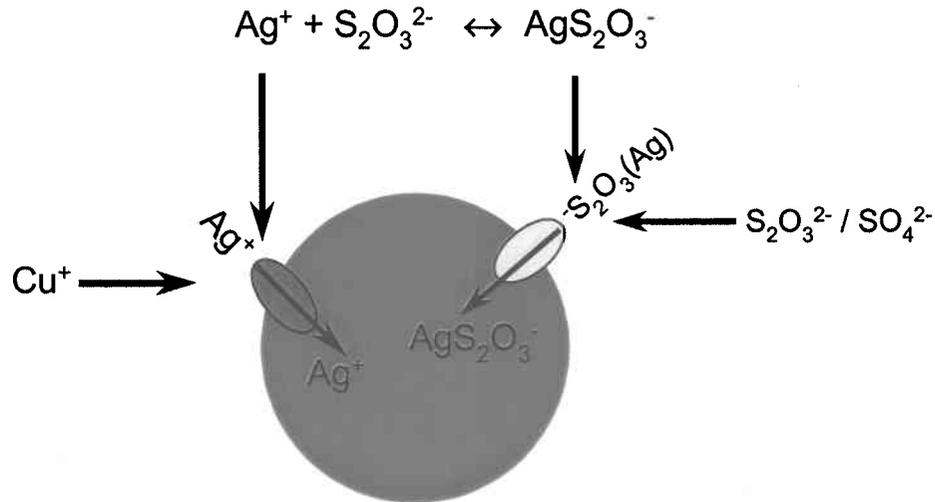


Figure 5.5 : Modèle conceptuel du transport de l'Ag chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de thiosulfate.

L'importance de la voie d'entrée du complexe argent-thiosulfate peut être déduite de façon quantitative à partir de la figure 5.3 (comparaison des colonnes G et H). Pour une concentration d'argent total constante de 104 nM, la prise en charge de l'Ag après une exposition de 15 minutes était deux fois supérieure en présence de thiosulfate (mais en absence de sulfate). La prise en charge de l'Ag est donc non seulement plus élevée que ce qui aurait été prédit sur la base de la concentration d'Ag⁺ mais est en fait stimulée par la présence du thiosulfate. La prise en charge résiduelle causée par la présence de 10 nM Ag⁺ dans le milieu G est estimée à 0,33 μmol•m⁻² (10 % de la colonne H) alors que la prise en charge entraînée par la présence de 94 nM AgS₂O₃⁻ dans le milieu G était de 6,1 μmol•m⁻² (colonne G moins 0,33 μmol•m⁻²). Sur une base équimolaire, la prise en charge d'Ag après 15 minutes serait de 32 nmol•m⁻²•nM pour Ag⁺ comparée à 65 nmol•m⁻²•nM pour le complexe AgS₂O₃⁻. Les taux de prise en charge de l'Ag à travers le système de transport de thiosulfate étaient donc environ deux fois supérieurs à ceux observés à travers le système de transport de cation.

Des mesures de cinétique de transport rapportées dans la littérature indiquent que la prise en charge de sulfate augmente lorsque les cellules sont carencées en soufre (Vallée et Jeanjean 1968a; Biedlingmaier et Schmidt, 1989; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992; Yildiz *et al.*, 1994; Matsuda et Colman, 1995; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Il a été suggéré que l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* puisse rapidement synthétiser un nouveau transporteur de haute affinité lorsque carencée en S (Yildiz *et al.*, 1994). Cette stimulation de la prise en charge du sulfate occasionnée par une carence en S peut se produire en moins de deux heures (Vallée et Jeanjean 1968a; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992; Yildiz *et al.*, 1994; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998) et même, dans un cas, en moins de 15 minutes (Matsuda et Colman, 1995) après une resuspension dans un milieu sans sulfate. Bien que dans la présente étude les cellules n'étaient pas carencées lors de la récolte, elles ont toutefois été rincées et resuspendues dans un milieu sans sulfate pendant environ 15 minutes avant d'être inoculées dans le milieu d'exposition, le temps de quantifier la densité algale. Chez *Chlamydomonas reinhardtii* toutefois, cette stimulation n'apparaît qu'après ~ 30 minutes de carence en S (J. Deault; communication personnelle) et ne devrait pas avoir joué un rôle dans l'augmentation observée de la prise en charge de l'Ag en présence de thiosulfate mais en absence de sulfate.

Le sulfate n'était toutefois pas seul à être en compétition avec le complexe AgS_2O_3^- . En effet, le thiosulfate libre rivalisait également pour l'entrée via le même transporteur. Ceci expliquerait les résultats de la figure 5.4, qui montre une relation croissante mais non linéaire entre $[\text{Ag}]_{\text{cell.}}$ et $[\text{Ag}^+]$. En augmentant la concentration de thiosulfate tout en conservant la concentration d' Ag_T constante, la concentration d' Ag^+ a diminué mais, en même temps, celle du thiosulfate libre a augmenté de sorte que le ratio $\text{AgS}_2\text{O}_3^- : \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ a considérablement diminué. Évidemment, ces deux ions entrent en compétition pour les sites de transport anioniques, donc, à mesure que la concentration de thiosulfate augmente, la prise en charge du complexe AgS_2O_3^- s'estompe, ce qui diminue d'autant $[\text{Ag}]_{\text{cell.}}$. De toute évidence, l'accumulation d'Ag observée ne peut être simplement expliquée par la concentration d' Ag^+ puisque la contribution de cette espèce ne devrait être significative qu'à la concentration la plus faible en thiosulfate, après quoi sa

concentration descend sous les nM (comparer les niveaux de prise en charge observés à la figure 3.1 pour $\text{Ag}^+ < 1 \text{ nM}$ avec ceux observés à la figure 5.4). Ainsi, l'accumulation d'argent diminue avec la proportion grandissante de thiosulfate libre par rapport à la concentration du complexe argent-thiosulfate (figure 5.6), indiquant que le transporteur n'est que partiellement saturé par l'excès de thiosulfate, ce qui est cohérent avec les K_m de SO_4^{2-} recensés pour cette espèce, qui se situent entre 1 et 50 μM (Yildiz *et al.*, 1994; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998), et supporte la conclusion d'une compétition à trois (SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ et AgS_2O_3^-) tel qu'illustré à la figure 5.5. L'hypothèse d'une prise en charge de l'argent par une voie de transport anionique est donc validée.

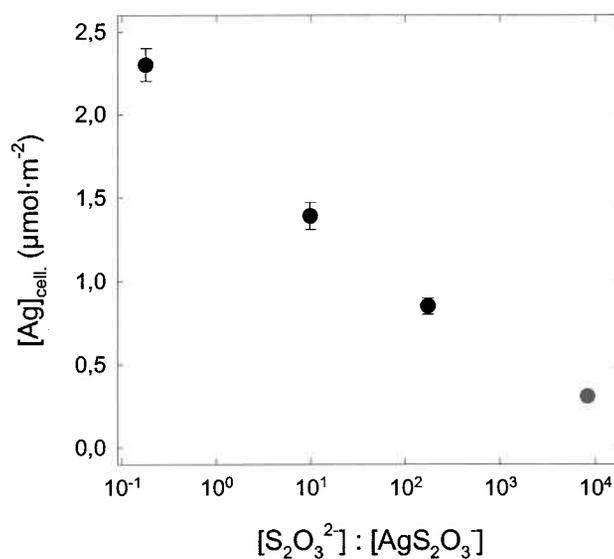


Figure 5.6 : Prise en charge de l'argent en fonction du ratio des concentrations de thiosulfate libre et du complexe argent-thiosulfate lorsque Ag_T est constant mais thiosulfate variable. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

5.5 Conclusion

Le paradigme prévalant dans l'interprétation de données de prise en charge des métaux par des organismes aquatiques, c'est-à-dire le MIL ou son dérivé, le modèle du ligand biotique (*Biotic Ligand Model* qui introduit de façon formelle les effets de compétition entre H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et les métaux; Meyer, 1999; Meyer *et al.*, 1999; DiToro *et al.*,

2000), présume que les métaux entrent dans les cellules vivantes par transport facilité de cations. La plupart des exceptions au MIL impliquent soit des ligands qui forment des complexes lipophiles, $M-L_n^0$, qui peuvent court-circuiter les mécanismes habituels de transport et traverser les membranes biologiques par simple diffusion passive (ex. : Phinney et Bruland, 1994), ou encore impliquent des ligands « chaperons » qui sont spécifiquement synthétisés par les micro-organismes afin de complexer des métaux essentiels et faciliter leur prise en charge éventuelle (ex. : le rôle des sidérophores dans la nutrition du Fe; Granger et Price, 1999). En revanche, personne n'avait démontré à ce jour que des métaux pouvaient être pris en charge par des transporteurs d'anions inorganiques. Seuls Kalfakakou et Simons (1990) ainsi que Lou *et al.* (1991) ont évoqué cette possibilité. En effet, ces auteurs ont proposé que le Zn et le Cd pouvaient emprunter un système de transport du carbonate comme voie d'entrée dans des cellules humaines (érythrocytes) sur la base d'observations indiquant une augmentation de la prise en charge de ces métaux avec une augmentation de la concentration en carbonates, sans toutefois offrir de preuves pour soutenir leur conclusion. À ce jour, les résultats exposés dans ce chapitre représentent donc pour la première fois de façon claire qu'il existe un mécanisme plausible permettant à un métal de pénétrer les cellules à l'aide de systèmes de transport d'anion inorganique.

5.5.1 Contexte environnemental

La signification environnementale de ces résultats dépendra de deux facteurs : (i) quelles sont les probabilités que des complexes argent-thiosulfate existent en milieu naturel; et (ii) à quel point ces systèmes de transport transmembranaire sont-ils généralisés chez les organismes aquatiques?

En solution reconstituée, la spéciation de l'Ag est fortement influencée par des ligands inorganiques simples (chlorure, thiosulfate), par des polysulfures, et par des ligands organiques possédant des groupements thiols; tous ces ligands peuvent être présents en milieu naturel. Le chlorure est un anion majeur en milieu naturel et se retrouve dans les rejets industriels ainsi que dans les rejets urbains. Le thiosulfate est moins commun en milieu naturel mais est présent en très grande quantité dans les effluents de laboratoires de

développement de photographie³ (Purcell et Peters, 1998). On retrouve également le thiosulfate à l'état naturel dans les eaux interstitielles de sédiments suboxiques (Luther *et al.*, 1986a, b; Thamdrup *et al.*, 1996) ainsi que dans les eaux usées des procédés de flottation de minerais (Druschel *et al.*, 1999). Les sulfures, bien que thermodynamiquement instables en milieu oxique, peuvent persister en zone oxygénée (Adams et Kramer, 1999a; Rozan et Benoit 1999; Rozan *et al.*, 2000) et être présents en concentration supérieure à celles habituellement observées pour l'Ag. La forme de ces sulfures réactifs est présentement peu connue mais les espèces potentielles incluent les sulfures dissous (stabilisés par complexation avec le Zn ou le Cu) ainsi que des agglomérations de polysulfures (possiblement enveloppés par ou enfouis dans de la matière organique naturelle; Rozan *et al.*, 2000). Si ces espèces de soufre réduit sont accessibles, ce qui semble être le cas (Rozan *et al.*, 2000), on peut s'attendre à ce qu'elles dominent la spéciation de l'argent dissous. Le thiosulfate ne serait pas en mesure d'entrer en compétition de façon efficace avec des espèces réduites de S(II) et les complexes argent-thiosulfate n'existeraient pas à des niveaux appréciables en milieu naturel. Si, toutefois, les espèces réduites de soufre (sulfures, polysulfures) que l'on retrouve dans le milieu naturel sont, d'un point de vue cinétique, inertes (étant enfouis dans la matière organique naturelle ou dans des *clusters*), ce qui expliquerait leur faible réactivité à l'oxygène, alors la probabilité que des complexes argent-thiosulfate puissent exister en milieu naturel devient plus grande. De plus, la capacité de la matière organique dissoute (MOD) à complexer l'Ag demeure à ce jour peu définie, et pourrait potentiellement jouer un rôle non-négligeable dans la spéciation de l'Ag en milieu naturel.

En ce qui concerne le deuxième facteur, il est certainement plausible que la prise en charge de complexes anioniques AgS_2O_3^- puisse être observée chez d'autres espèces d'algues, ainsi que chez des bactéries possédant un système de transport de sulfate / thiosulfate ou même des transporteurs spécifiques de thiosulfate. Des organismes aquatiques supérieurs tels que les poissons possèdent des mécanismes de transport du

³ Ces effluents sont habituellement déversés dans le réseau d'égout urbain, menant à un système de traitement où les concentrations de sulfures excèdent largement les concentrations d'Ag et contrôlent donc la spéciation de ce métal (Adams et Kramer, 1999a, b). Les usines de traitements d'eau enlève de 48 à 95 % de l'argent acheminé à l'usine (Lytle, 1984).

sulfate situés dans les cartilages branchiaux (Rosenthal, 1961; Duan et Inui, 1990). Toutefois, aucune publication ne fait mention de tels systèmes de transport au niveau de l'interface eau-branchies. Plusieurs observations d'accumulation d'Ag « anormalement » élevées dans les branchies de poissons demeurent inexplicées à ce jour (Janes et Playle, 1995; Hogstrand *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 1996b). Cette nouvelle voie d'entrée découverte chez les algues pourrait également s'appliquer à cette situation, mais la métabolisation du thiosulfate chez les poissons reste à être démontrée.

6. TOXICITÉ

6.1 Introduction

Il existe très peu de données concernant la toxicité de l'argent envers les algues unicellulaires. Selon les quelques données disponibles, la concentration effective d'argent inhibant 50 % de la croissance des algues (CE50) peut varier grandement selon l'espèce utilisée, le temps d'exposition, le paramètre de croissance utilisé et les conditions d'exposition. Notons que dans le peu d'études recensées, très peu ne font mention de la spéciation de l'argent. Plusieurs auteurs accordent, à tort, une importance à la forme solide choisie (habituellement le nitrate ou le chlorure d'argent) pour préparer les solutions mères. La forme solide choisie ne fournit toutefois aucun renseignement sur la spéciation de l'argent une fois le solide dissous.

L'évaluation d'une CE50 chez *Chlamydomonas reinhardtii* n'est pas aussi simple pour l'argent que pour d'autres métaux tels que le Cd, le Zn et le Cu. En effet, la toxicité est habituellement déterminée en surveillant la croissance des algues dans un milieu où la concentration en métal libre est adéquatement tamponnée, afin d'éviter une diminution de sa concentration par adsorption, prise en charge ou complexation par des exsudats. Toutefois, les ligands habituellement employés pour tamponner la concentration en métal libre, tels que le NTA (acide nitrilotriacétique) et l'EDTA (acide éthylènediamine-tétraacétique), ont une affinité trop faible pour l'Ag (voir chapitre 2) et on n'a pas pu identifier d'autres ligands ayant les caractéristiques nécessaires (ligand non métabolisable et de forte affinité pour l'argent par rapport au Ca et au Mg). Suite aux expériences de prise en charge de l'Ag (chapitre 3), on peut s'attendre à ce que l'argent soit rapidement épuisé du milieu d'exposition sur une période de plusieurs heures. Ainsi, sur une période de croissance de quatre jours, la concentration d'argent devrait diminuer grandement, ce qui ne permet pas d'identifier un effet pour une concentration donnée mais seulement pour une concentration de départ. Signalons que les quelques études identifiées dans le chapitre 1 (USEPA, 1987; Turbak *et al.*, 1986; Rai et Razada, 1985) ne tenaient pas compte de cette difficulté. Afin de minimiser les fluctuations dans la concentration d'Ag,

un turbidostat peut être utilisé. Ce type d'appareil permet de maintenir une turbidité constante, c'est-à-dire une population d'algues constante. Ainsi, lorsque la population augmente par division cellulaire, la turbidité croît et le système active une pompe qui retire un certain volume du milieu pour le remplacer par du milieu frais. En diluant le milieu, la turbidité diminue et lorsque la turbidité désirée est atteinte, la pompe est désactivée. En maintenant une population d'algues faible, il est possible de minimiser la présence d'exsudats qui peuvent complexer l'Ag, ainsi que les pertes d'Ag par prise en charge et adsorption. De plus, l'activation périodique de la pompe assure un ajout constant de milieu frais contribuant à stabiliser les concentrations de métal et de ligand ainsi que le pH de la culture. Dans la mesure où l'apport d'Ag frais est supérieur au taux de prise en charge, il est donc possible de maintenir la concentration d'Ag dissous constante. Cette approche a déjà été utilisée afin de déterminer la toxicité du Se (Bennett, 1988) et du Cd (Bennett et Brooks, 1989; Bennett, 1990) envers les algues unicellulaires.

La toxicité de l'Ag envers les poissons est mieux documentée que pour les algues. La concentration provoquant 50 % de mortalité (CL50) envers une population de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après sept jours d'exposition était de 30 nM Ag^+ , et ce de façon conforme au modèle de l'ion libre (MIL) en présence de chlorure comme agent complexant (Hogstrand et Wood, 1998). Cette CL50 augmentait jusqu'à 1,27 mM Ag_T en présence d'excès de thiosulfate (ratio 4 : 1; $[Ag^+] \sim pM$; Hogstrand *et al.*, 1996). Bien que la présence de thiosulfate ait pour effet de diminuer la toxicité, des mesures d'accumulation ont révélées une présence accrue d'Ag dans le sang de ce poisson, indiquant une prise en charge de l'Ag supérieure à ce qui était attendu sur la base de la concentration en Ag^+ (Wood *et al.*, 1996b). Selon ces derniers auteurs, cette observation s'expliquerait par une prise en charge des complexes $Ag(S_2O_3)_n^{1-2n}$ par une voie distincte de celle utilisée par l' Ag^+ qui serait responsable de l'effet toxique au niveau des branchies.

Dans ce cadre général, les objectifs recherchés dans cette phase des recherches étaient : i) d'évaluer deux méthodes pour déterminer la toxicité de l'Ag envers les algues (en lots ou en turbidostat); ii) à l'aide de la meilleure méthode, de déterminer la CE50 de l' Ag^+

envers *Chlamydomonas reinhardtii*; et iii) de déterminer si la présence de thiosulfate mène à une augmentation de la toxicité.

6.2 Méthodologie et tests préliminaires

6.2.1 Expériences en lots

En premier lieu, l'effet de l'Ag sur la croissance de l'algue *C. reinhardtii* a été suivi en lots. Dix flacons de 250 mL (polycarbonate; Nalgene) contenant 100 mL de milieu MHSM-1 ont été inoculés simultanément à une densité de départ de $2\,500\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. La moitié de ces flacons contenait 10 nM d'Ag alors que l'autre moitié servait de témoin. À chaque jour pendant quatre jours, la densité cellulaire et le pH ont été mesurés dans chaque flacon. Cette expérience a été répétée en utilisant la souche mutante de *C. reinhardtii* ne possédant pas de paroi cellulaire. À nouveau, la densité cellulaire a été déterminée quotidiennement ainsi que la concentration d'Ag dissous (filtre Acrodisc 0,45 μm ; Gelman).

6.2.2 Expériences en turbidostat

Le turbidostat (Dephy Technologies, Québec, Canada) consiste principalement en un émetteur et un récepteur permettant de quantifier la turbidité d'une solution. Un signal est émis à 910 nm (infrarouge) pulsé à une fréquence de 1 kHz et est intégré sur une période de 2,3 sec. La mesure est alors acheminée à un micro-ordinateur et, à l'aide d'un logiciel (LabView 5.0; National Instruments), peut être emmagasinée ou utilisée afin de déterminer si une pompe doit être activée ou non afin de rétablir le niveau de turbidité à un niveau préétabli. La figure 6.1 illustre le montage.

6.2.2.1 *Montage*

Trois turbidostats en série ont été construits. Chaque turbidostat était relié à une pompe (Cole-Parmer; type L / S, 1 – 100 rpm). Des tuyaux de silicone (L / S 14; Norton 3350) étaient insérés dans les deux têtes de pompe (Masterflex; L / S 7014-20) et connectés à l'entrée et à la sortie de la pompe à des tuyaux de Teflon® (TFE C-17; Cole-Parmer) reliant le turbidostat au milieu frais et à la vidange (figure 6.1). Le turbidostat consistait

simplement en un bocal de polycarbonate (VWR Canlab) d'une capacité d'un litre, dont le couvercle avait été modifié afin d'y fixer un émetteur et un récepteur, tous deux insérés dans des tubes de quartz ultrapur. Ces tubes de quartz baignaient donc dans la solution de culture et descendaient jusqu'à environ 5 cm du fond. Cette hauteur était suffisante pour éviter une interférence dans la lecture du signal provenant du mouvement du barreau aimanté servant à l'agitation du milieu. De même, un volume total de 750 mL suffisait pour éviter une interférence similaire par les reflets causés par le mouvement de l'eau à la surface.

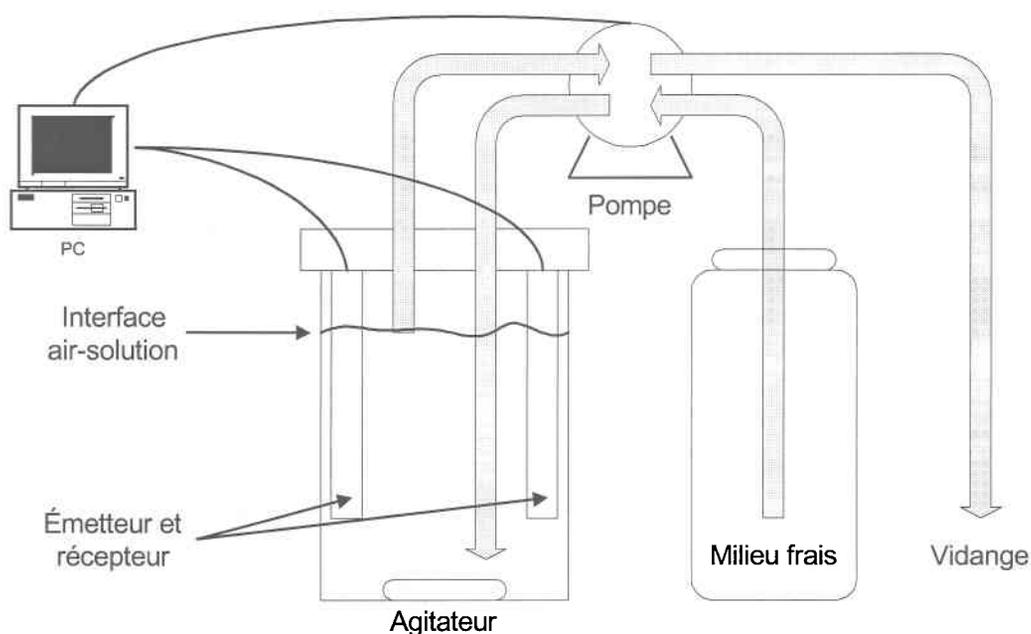


Figure 6.1 : Schéma illustrant le montage du turbidostat

Le débit était préalablement ajusté à environ $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ à l'aide d'un contrôleur de pompe (Masterflex). Les tuyaux d'entrée et de sortie du turbidostat étaient placés sur la même pompe afin d'obtenir un débit similaire. Toutefois, étant donné que les tuyaux utilisés n'ont pas toujours exactement le même diamètre interne, il en résulte un débit légèrement différent à l'entrée et à la sortie du turbidostat et, à long terme, des fluctuations dans le volume total. Afin de prévenir les changements de volume, le tuyau de sortie était fixé directement à la surface du milieu de culture et connecté à un tube de pompage préalablement usé. Les tubes déjà utilisés donnant des débits un peu plus élevés,

le niveau de la solution ne pouvait descendre en deçà de l'extrémité du tuyau. Ainsi, le volume du turbidostat devenait pratiquement constant. Le tuyau d'entrée était placé tout au fond du bocal en s'assurant qu'il ne puisse interférer dans la lecture du signal. La distance séparant l'entrée (au fond) et la sortie (à la surface) favorisait le mélange du milieu frais avec la culture avant qu'il ne soit évacué. L'agitation était ajustée au réglage le plus bas (~ 2 Hz) pour éviter la formation d'un vortex qui interfère avec la mesure de turbidité. L'agitation était toutefois nécessaire pour maintenir les cellules en suspension.

6.2.2.2 *Seuil de détection*

Un seuil de détection devait être fixé par l'utilisateur. Ce seuil, exprimé en volts (V), déterminait si la pompe devait être activée ou non en fonction du signal mesuré. La fenêtre de travail, fixée par le fabricant, se situait entre 1,57 et 1,67 V. Ainsi, lorsque la turbidité augmentait, le signal diminuait et passait éventuellement sous la valeur fixée, ce qui entraînait l'activation de la pompe par le système. Le temps minimum de pompage pouvait être prédéterminé par l'utilisateur. Cette option permettait d'éviter que la pompe ne soit activée que pour quelques secondes, ce qui engendrait des fluctuations dans le débit causées par le délai de réaction de la pompe. Pour toutes les expériences, ce temps minimal de pompage était fixé à 20 sec.

6.2.2.3 *Variabilité du signal*

Malgré les précautions décrites précédemment, il existait une variabilité importante dans le signal mesuré. Afin de quantifier cette variabilité, le signal du turbidostat a été suivi pendant six jours en absence d'algues. La figure 6.2 révèle deux types de variation : i) une variabilité immédiate d'environ 2 mV (bruit de fond); et ii) une dérive du signal à plus long terme, d'une amplitude d'environ 8 mV. Afin de contrer l'effet du premier type de variabilité, une option a été programmée afin de lisser les données sur plusieurs lectures. Cette option permettait de déterminer le signal moyen sur un nombre prédéterminé de lectures, lequel nombre pouvait être fixé par l'utilisateur. En se servant de cette moyenne plutôt que du signal brut, on peut pratiquement éliminer le bruit de fond. Pour les expériences décrites plus bas, la pompe était donc déclenchée seulement si la moyenne

des 30 dernières lectures était inférieure au seuil de détection choisi. Quant à la dérive du signal à plus long terme, elle semblait être causée par de faibles interférences électriques et des fluctuations dans la masse (*ground*). Cette dérive avait donc des répercussions sur la densité cellulaire d'une culture sous contrôle puisque le seuil de détection demeurait fixe. Afin de quantifier la réponse du turbidostat en fonction de la quantité de cellules et d'évaluer l'effet de ces fluctuations dans le signal, un calibrage de l'appareil à de faibles densités cellulaires ($0 - 7000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été effectué. Pour ce faire, les moyennes de 20 mesures ont été enregistrées cinq fois après chaque ajout d'algues à partir d'une culture dense.

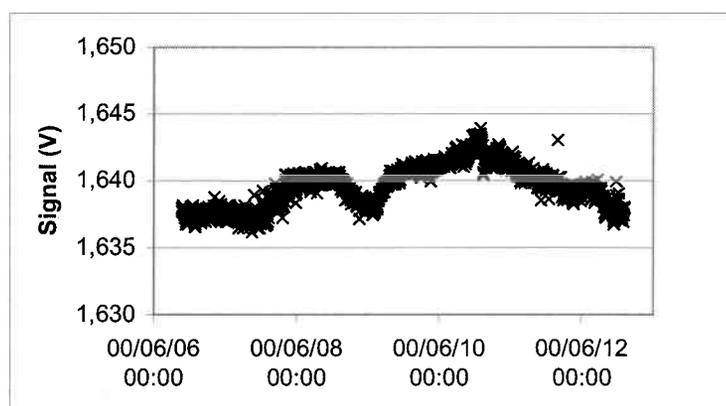


Figure 6.2 : Exemple de l'évolution du signal du turbidostat sur plusieurs jours en absence d'algues.

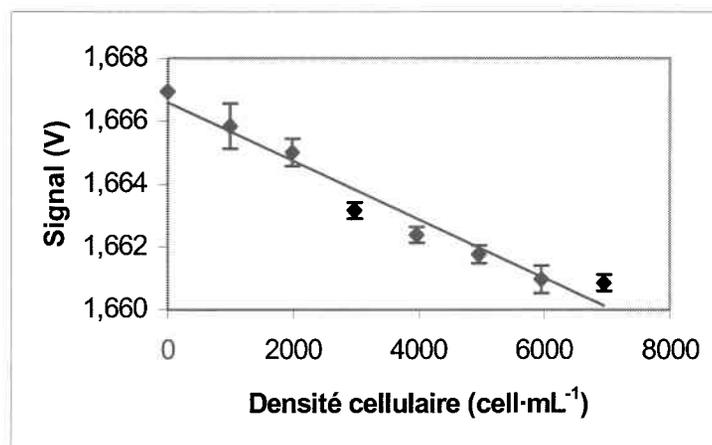


Figure 6.3 : Calibrage du turbidostat en fonction de la densité cellulaire. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

D'après la figure 6.3, chaque tranche de 1000 cell.●mL⁻¹ abaisse le signal de 0,93 mV. On peut donc s'attendre à des fluctuations d'une amplitude d'environ ± 10 000 cell.●mL⁻¹ lors d'un contrôle de culture en turbidostat sur une longue période.

6.2.2.4 Calcul du taux de croissance

À chaque occasion où la pompe était déclenchée, le temps de pompage (t_p ; min) et l'heure étaient enregistrés dans un fichier. En sachant le débit de milieu frais introduit dans le turbidostat (D ; mL●min⁻¹), il était possible de calculer un taux de croissance (μ ; div.●jr⁻¹) sur une période donnée (t ; jours) à l'aide de l'équation (6.1) :

$$\mu = \frac{D \cdot t_p}{V \cdot (t - t_o)} \quad (6.1)$$

où V est le volume du turbidostat (mL). Cette équation n'est toutefois valide que lorsque la densité cellulaire demeure constante. Comme les fluctuations du signal dans le temps a fait varier considérablement la densité cellulaire, le taux de croissance a dû être ajusté afin de tenir compte de ces changements. Ainsi, le taux de croissance devient :

$$\mu = \frac{D \cdot t_p}{V \cdot (t - t_o)} + \frac{(\ln N_t - \ln N_{t_o})}{(t - t_o) \cdot (\ln 2)} \quad (6.2)$$

où N est la densité cellulaire mesurée (compteur de particules; Coulter) à la sortie du turbidostat aux temps t_o (initial) et t (final).

6.2.2.5 Expériences de toxicité

À l'aide du turbidostat, la toxicité de l'Ag⁺ envers *C. reinhardtii* a été évaluée. D'abord, le taux de croissance a été déterminé sur une période de 12 heures en absence d'Ag, ce taux était ensuite utilisé comme valeur de référence. Par la suite, à chaque intervalle de 12 heures, de l'argent a été ajouté simultanément à la culture et à la solution d'alimentation afin d'obtenir des concentrations de 1, 10, 60, 80 et 100 nM d'Ag_T. Dans une seconde expérience, des concentrations de 0 (témoin), puis de 30 et finalement de 137 nM d'Ag_T ont été testées. Lors du dernier ajout d'Ag (concentration finale de 137 nM Ag_T), du thiosulfate a été introduit dans les milieux de croissance ainsi que dans les milieux frais afin d'obtenir une concentration nominale de 30 nM Ag⁺ ([S₂O₃²⁻]_T = 114 nM). En

comparant ainsi la réponse de la croissance entre les deux derniers ajouts ($[Ag_T] = 30$ vs 137 nM; $[Ag^+] = 30$ nM dans les deux cas), l'influence du thiosulfate sur la toxicité de l'Ag a été évaluée. Occasionnellement, le pH a été mesuré et les concentrations d'Ag dans les milieux ont également été mesurées en utilisant le radio-isotope de l'Ag comme traceur. La densité cellulaire cible était de $20\ 000\ \text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ et cette densité a été contrôlée avant chaque ajout d'Ag.

6.3 Résultats

6.3.1 Expériences en lots

L'ajout de 10 nM d'Ag aux milieux de culture de *C. reinhardtii* a retardé la croissance des algues et ce, pour les deux souches (figures 6.4A et 6.5A). L'effet s'est toutefois fait sentir de façon plus prononcée dans le cas de la souche mutante sans paroi cellulaire (figure 6.4A). En effet, la phase initiale a été retardée de près d'une journée, ce qui correspond à peu près au temps nécessaire pour faire diminuer de façon appréciable la concentration d'Ag dissous (figure 6.4B), ce qui est cohérent avec l'observation ultérieure que la concentration d'Ag s'épuise rapidement en présence des algues. Après une journée, plus de 70% de l'Ag dissous avait disparu et après quatre jours, il restait moins de 10% de la concentration originale de 10 nM. Quant à la souche autochtone, elle a semblé être moins affectée par la présence d'Ag. Néanmoins, sa population en a été significativement affectée aux jours 1 et 2 (test de Student; $P < 0,05$) pour ensuite rejoindre la densité cellulaire des flacons témoins au jour 3. Le suivi quotidien du pH a révélé une baisse importante au troisième jour lorsque la population était en fin de croissance exponentielle.

6.3.2 Expériences en turbidostat

L'effet de l'Ag sur le taux de croissance (équation 6.2) de *C. reinhardtii* a été déterminé sur une période de 12 heures sur des cellules maintenues en croissance exponentielle. Les effets délétères de l'Ag apparaissent très rapidement avec des taux respectifs d'inhibition de croissance de $12, 24, 58, 93, 100$ et 100% à $1, 10, 30, 60, 80$ et 100 nM (figure 6.6). Il est à noter qu'aucune croissance n'a été décelée à partir de 80 nM d'Ag⁺. À partir de ces données, une CE50 de 26 ± 3 nM a été déterminée à l'aide du logiciel ICp (méthode bootstrap; USEPA, 1993).

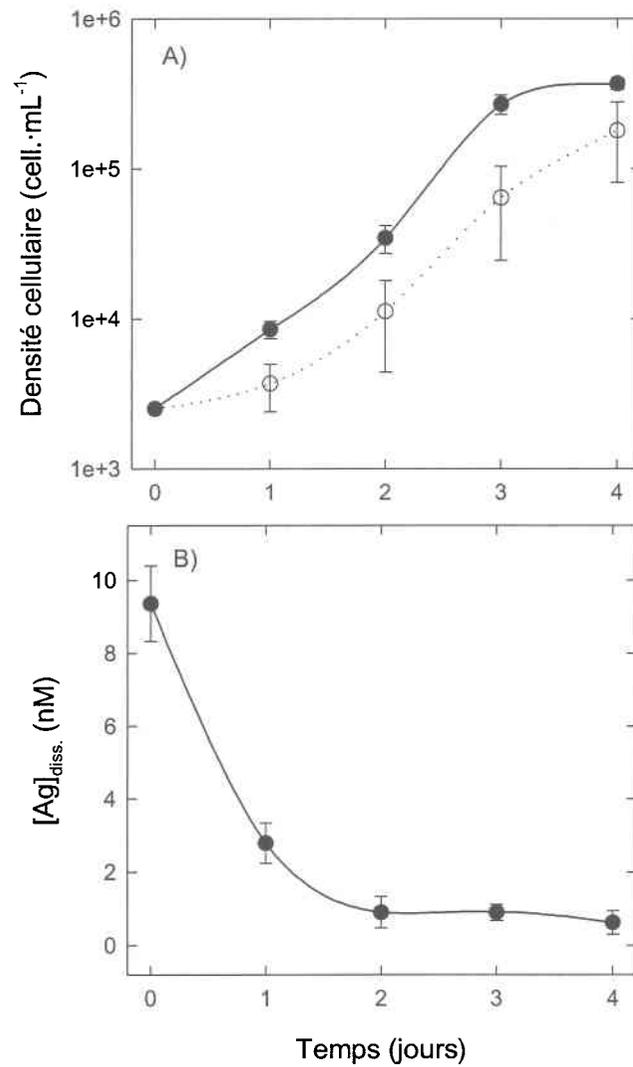


Figure 6.4 : Effet de l'Ag sur la croissance de *C. reinhardtii* (sans paroi) en culture par lots. (A) Densité cellulaire en fonction du temps (○ = 10 nM Ag⁺; ● = témoin sans ajout d'Ag; N = 5). (B) Concentration de l'Ag « dissous » en fonction du temps. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

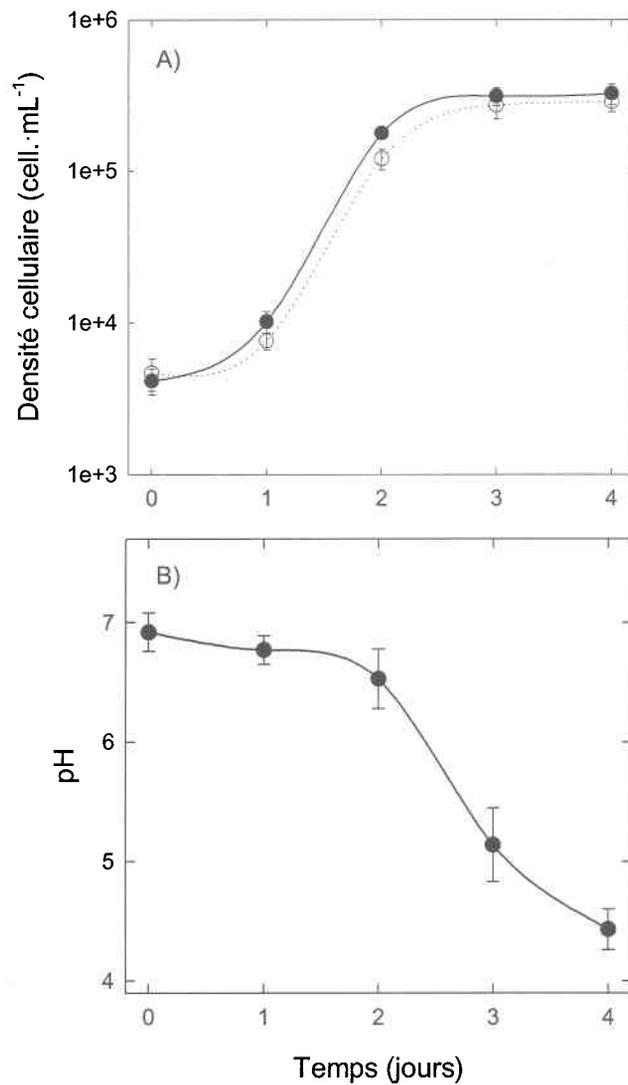


Figure 6.5 : Toxicité de l'Ag sur la croissance de *C. reinhardtii* (avec paroi) en culture par lots. (A) Densité cellulaire en fonction du temps (○ = 10 nM Ag⁺; ● = témoin sans ajout d'Ag; N = 5). (B) pH des milieux en fonction du temps tous traitements confondus (N = 10). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

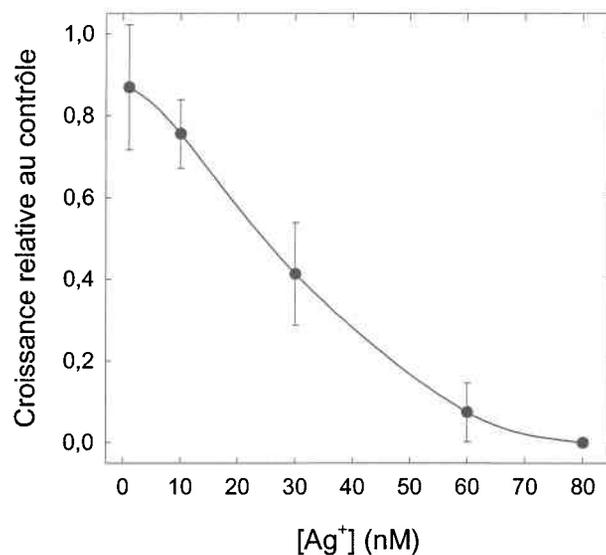


Figure 6.6 : Taux de croissance relatif de *C. reinhardtii* par rapport aux témoins, mesuré sur 12 heures en turbidostat en fonction de la concentration d'Ag ajoutée. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 6.1 : Taux de croissance de *C. reinhardtii* mesuré sur 12 heures en turbidostat en présence (N = 2) et en absence (N = 3) de thiosulfate pour une même concentration d'Ag⁺ nominale de 30 nM.

| Traitement | Croissance (div. • j ⁻¹) |
|--|--------------------------------------|
| Témoin | 1,6 ± 0,3 |
| 30 nM Ag ⁺ sans ligand | 0,69 ± 0,24 |
| 30 nM Ag ⁺ avec thiosulfate | 0 ± 0 |

L'ajout de 114 nM de thiosulfate a eu un effet néfaste sur la croissance (tableau 6.1). Toutefois, suite à une dérive importante du signal d'un des trois turbidostats, les données d'un réplicat ont été perdues. Malgré cet incident, les taux de croissance entre les deux traitements (30 nM Ag⁺ sans ligand vs 30 nM Ag⁺ avec thiosulfate) étaient tout de même significativement différents (test de Student; $P < 0,05$; tableau 6.1), ces taux étant nuls en présence de thiosulfate. Ces résultats confirment donc que l'augmentation de prise en

charge de l'Ag en présence de thiosulfate mène aussi à une augmentation de la toxicité de l'Ag.

Les concentrations d'Ag mesurées dans les milieux frais étaient respectivement de 32 et 133 nM en absence et en présence de thiosulfate, soit très près des valeurs nominales désirées (respectivement 30 et 137 nM). De plus, la concentration totale à la fin de l'expérience était de 128 ± 12 nM. Quant au pH moyen, il était de $7,4 \pm 0,2$ (N = 9), soit légèrement supérieur au pH cible de 7,0.

6.4 Discussion

6.4.1 Expériences en lots

Les algues cultivées en présence d'Ag (10 nM) ont affiché une croissance retardée en comparaison des témoins (figures 6.4A et 6.5A). Cet effet était plus prononcé chez la souche sans paroi, qui a néanmoins repris un rythme de croissance normal 24 h après l'inoculation. La reprise de la croissance coïncide avec une baisse importante de la concentration d'Ag dissous. On peut donc croire qu'une concentration aussi faible que 10 nM d'Ag peut avoir un effet significatif sur la croissance de *C. reinhardtii*. Cet effet est toutefois difficile, voire impossible, à quantifier étant donné que les conditions d'exposition, telles que la concentration d'Ag dissous et le pH (figures 6.4B et 6.5B), ont varié grandement. Ainsi, à mesure que la population d'algue augmentait, la concentration d'Ag dissous diminuait et l'effet de l'Ag s'estompait rapidement dans le temps. Il est à noter que les filtres utilisés pour mesurer l'Ag dissous peuvent avoir adsorbé une certaine partie de l'Ag prélevé des milieux et ainsi entraîné une sous-estimation de la concentration d'Ag comme l'ont confirmé les tests ultérieurs avec des filtres similaires (voir section 6.4.2). Il semble néanmoins que la concentration d'Ag diminue de façon marquée du premier au quatrième jour.

Il est donc pratiquement impossible de déterminer la toxicité de l'Ag sur nos algues par des cultures en lots sans y tamponner la concentration d'Ag en solution. L'ajout d'un tampon pourrait toutefois altérer les résultats en augmentant la concentration totale d'Ag dans la couche diffuse séparant l'algue de son milieu (voir chapitre 4, section 4.4.2). Si la

prise en charge est réellement limitée par la diffusion de l'Ag à travers cette couche (chapitre 4), ce phénomène serait anéanti par la présence de complexes se dissociant rapidement à l'intérieur de la phycosphère. Bien qu'il n'a pas été possible d'identifier un ligand permettant d'agir comme tampon, une approche impliquant une résine échangeuse d'ions comme source de métal (ex. : Smolders et McLaughlin, 1996b) pourrait être intéressante. Cette approche aurait l'avantage de permettre une concentration constante d'Ag dissous sans toutefois introduire de complexes (Ag – tampon) dans la phycosphère. En revanche, cette approche nécessite qu'une quantité de résine soit préparée pour chaque concentration d'Ag à tester, ce qui entraîne un long temps de préparation. De plus, l'utilisation d'une résine ne pourrait compenser pour les pertes en ligands si le ligand en question est métabolisable (ex. : le thiosulfate).

6.4.2 Expériences en turbidostat

Le turbidostat a donc été choisi comme outil pour déterminer la toxicité de l'Ag. Le renouvellement constant du milieu permet de maintenir les concentrations d'Ag et de thiosulfate plus stables qu'en lots, à condition que le taux de renouvellement soit égal à celui de la prise en charge. Avec un taux de prise en charge de $1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (figure 3.2) à une concentration de 10 nM Ag et un volume de turbidostat de 800 mL, on peut estimer de façon approximative la perte maximale en Ag à 0,7 nmol après une heure d'exposition en présence de $10\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. De même, avec un taux de croissance d'environ $2 \text{ div}\cdot\text{j}^{-1}$, un volume d'environ 70 mL du turbidostat sera renouvelé, soit l'ajout de 0,7 nmol. Comme cet ajout sera dilué dans tout le volume du turbidostat (~ 800 mL), on peut s'attendre à un léger déficit d'Ag dans le temps. Il est donc crucial de travailler à la plus faible densité cellulaire possible, sans toutefois risquer une évacuation complète des algues en cas de dérive du signal. Les concentrations d'Ag dissous tel que mesurées à cinq reprises dans chaque turbidostat par filtration à $0,45 \mu\text{m}$ (*ion chromatography Acrodisc*; Gelman) ont indiqué des concentrations inférieures d'environ 50 % aux concentrations initiales. Un test ultérieur a toutefois révélé que cette différence était causée par l'adsorption de l'Ag sur le filtre qui a été évalué à ~ 60 % (ces filtres n'étant pas les mêmes que ceux utilisés lors de l'expérience en lots, on ne peut utiliser ce taux d'adsorption avec certitude sur les résultats précédents de la figure 6.4B).

Néanmoins, les mesures n'ont pas indiqué de diminution de la concentration dans le temps. Bien qu'aucune mesure fiable de la concentration d'Ag dissous n'ait été obtenue au cours de l'expérience, la concentration totale moyenne d'Ag à la fin de l'expérience dans les trois turbidostats était de 128 ± 12 nM, indiquant que l'Ag accumulé par les algues et évacué par le remplacement du milieu n'avait pas affecté significativement la concentration d'Ag total dans le milieu (concentration nominale de 137 nM et concentration mesurée de 133 nM dans le milieu de remplacement).

En absence de ligands, une concentration en Ag^+ libre de 26 nM suffit pour inhiber de moitié la croissance de *C. reinhardtii*. À une concentration de 1 nM, la croissance était déjà légèrement inférieure au groupe témoin mais de façon non significative (test de Student; $P = 0,40$). Lorsque cette concentration atteignait 10 nM, l'inhibition devenait significative (test de Student; $P < 0,05$) et la croissance était presque complètement anéantie à 60 nM d' Ag^+ . Au-delà de cette concentration, la population d'algue diminuait à cause de l'éclatement des cellules, résultant en des taux de croissance négatifs. À 80 et 100 nM Ag, et ce dans tous les turbidostats, aucune croissance n'a été détectée et une valeur nulle a alors été attribuée lorsque $\mu < 0$. Ainsi, la quantité de débris cellulaires de taille $< 2 \mu\text{m}$ augmentait avec le temps d'exposition alors que le diamètre moyen des cellules était légèrement plus élevé que lors de la culture du groupe témoin (5 μm plutôt que 4 μm). L'effet toxique ultime semble donc mener à la rupture de la membrane plasmique et semble relié au mécanisme de division cellulaire. Ceci soulève une question importante : qu'advient-il de la spéciation de l'Ag lorsque des cellules éclatent? Il est plus que probable que certaines composantes du cytosol pourront complexer efficacement l'Ag en solution; ce qui mènerait à une sous-estimation de l'effet de ce métal. Si, toutefois, l'éclatement des cellules ne se produit que lorsque la concentration d'Ag atteint ~ 60 nM, alors on peut s'attendre à ce que la CE50 déterminée ne soit pas corrompue par cet effet. D'ailleurs, les mesures de densité cellulaire effectuées à 30 nM d'Ag ont pas révélé la présence de débris de taille $< 2 \mu\text{m}$.

La présence des complexes argent – thiosulfate a amplifié les effets délétères de l'argent envers les algues. Malgré une concentration d' Ag^+ de seulement 30 nM, la présence de

complexes AgS_2O_3^- à une concentration de 107 nM a semblé nuire considérablement à la croissance des cellules. En effet, conformément à ce qui a été observé en absence de ligands lorsque la concentration d' Ag^+ atteignait les 80 nM, la croissance nette était négative et la présence de débris cellulaires de taille $< 2 \mu\text{m}$ était observable. Ces résultats indiquent donc que la prise en charge des complexes AgS_2O_3^- par les algues mène à une augmentation de la toxicité, contrairement à ce qui a été observé chez les poissons (Wood *et al.*, 1996b).

Au Canada, le critère de qualité de l'eau pour l'Ag est de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,9 nM) alors qu'aux États-Unis ce critère est exprimé en fonction de la dureté de l'eau selon l'équation suivante :

$$[\text{Ag}_T] = e^{1,72[\ln(\text{dureté})]-6,52} \quad (6.3)$$

Ainsi, la concentration totale ou « filtrable » de l'Ag ne doit pas excéder ce critère (Karen *et al.*, 1999). La dureté du milieu MHSM-1 étant de $14,9 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, le critère s'appliquant à ce milieu est de $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1,4 nM). Ces critères correspondent donc à peu près à la concentration où aucun effet significatif n'avait été observé sur notre algue (1 nM; figure 6.6).

6.5 Conclusion

L'argent est un métal très toxique. En effet, en absence de ligands complexants, la concentration d'Ag causant une inhibition de 50 % de la croissance de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* est de 26 nM. À titre d'exemple, la CE30 du Cd pour cette même algue est de 100 nM Cd^{2+} (Macfie *et al.*, 1994). Le tableau 6.2 dresse un bilan des valeurs de CE50 recensées dans la littérature. De ce tableau on peut déduire que le CE50 déterminé dans cette étude se situe dans les valeurs les plus faibles mais il est fort probable que ces autres valeurs soient surestimées puisque la spéciation du métal n'a pas été considérée. De plus, la présence de thiosulfate augmente la toxicité de l'Ag à concentration d' Ag^+ égale. La stimulation de prise en charge observée précédemment (chapitre 5) semble donc entraîner une plus grande toxicité.

Tableau 6.2 : Bilan des valeurs de toxicité d'Ag connues pour les algues

| Algue | CE50 (nM) | Référence |
|----------------------------------|-------------|-------------------------------|
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | 25100 | Fisher <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Emiliana huxleyi</i> | 316 | Fisher <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Oscillatoria woronichinii</i> | 79 | Fisher <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i> | 1260 | Fisher <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Scenedesmus acutiformis</i> | 190 | Stokes, 1981 |
| <i>Scenedesmus acuminatus</i> | 70 | Stokes, 1981 |
| <i>Ditylum brightwellii</i> | > 550 | Canterford et Canterford 1980 |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | 24 | USEPA, 1987 |
| <i>Skeletonema costatum</i> | 1200 – 1600 | USEPA, 1987 |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | 59 | Turbak <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Nostoc muscorum</i> | 34 | Rai et Razada, 1985 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 26 | Cette étude |

Suite à ces expériences, on peut conclure que la toxicité de l'argent envers les algues est encore plus difficile à déterminer qu'on ne l'avait présagé au départ. En effet, les expériences traditionnelles en lots ne peuvent être effectuées sans l'utilisation d'un tampon à métal efficace. L'utilisation d'une résine échangeuse d'ions pourrait s'avérer utile comme tampon, mais peut également présenter des problèmes techniques (interférence des billes de résine avec le compteur de particules utilisé pour mesurer la densité cellulaire, par exemple). La méthode de turbidostat choisie ici semble prometteuse. Bien que le turbidostat subisse occasionnellement les contrecoups d'une dérive électronique du signal, le perfectionnement de cet outil pourrait s'avérer fort utile pour évaluer la toxicité de l'argent et d'autres métaux sur les cultures d'algues.

7. CONCLUSION

L'argent a été identifié depuis longtemps comme un élément très toxique et dont la mobilisation par l'activité humaine est très importante. Pourtant, l'Ag n'a fait l'objet que de peu d'études écotoxicologiques comparativement à d'autres éléments toxiques. Tout comme pour les autres métaux, on peut s'attendre à ce que la spéciation de l'argent soit importante dans l'interprétation des effets de ce métal sur les organismes aquatiques. En absence d'espèces de soufre réduit, la spéciation de l'argent en solution peut fortement être influencée par deux ligands inorganiques simples, le chlorure et le thiosulfate, formant une série de complexes stables. Dans ce contexte, une question clé se pose : En présence de chlorure ou de thiosulfate, peut-t'on prédire l'accumulation et la toxicité de l'argent en fonction de la concentration de l'ion Ag^+ libre? En effet, la plupart des observations expérimentales de prise en charge, de bioaccumulation et de toxicité des métaux chez les organismes aquatiques peuvent être expliquées par le modèle de l'ion libre (MIL). Il existe toutefois des exceptions à ce modèle, dont la plupart impliquent soit des complexes du métal avec des ligands organiques assimilables (le métal est alors transporté accidentellement), soit des complexes lipophiles qui peuvent diffuser de façon passive à travers les membranes biologiques. Dans le cas d'une exception au MIL en présence de l'argent et de ses chloro- / thiosulfato-complexes, comment expliquerait-on ce phénomène?

Les objectifs de cette recherche consistaient à (i) déterminer si la prise en charge de l'argent à court terme (< 1 h) pouvait être accentuée par la présence de chlorure ou de thiosulfate (non-respect du MIL) et (ii) identifier le ou les mécanismes responsables de ce comportement. Pour ce faire, une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, a été utilisée comme organisme cible et un radio-isotope de l'argent ($^{110\text{m}}\text{Ag}$) a été utilisé comme traceur.

La prise en charge de l' Ag^+ par l'algue *C. reinhardtii* est rapide et linéaire sur une période d'une heure et peut être inhibée par l'ajout de Cu (effet antagoniste). Cette observation,

combinée à la présence d'une enzyme réductrice du Cu(II) en Cu(I) chez l'algue *C. reinhardtii*, renforce l'hypothèse du transport accidentel de l'Ag⁺ via la voie d'entrée du Cu(I). Cette voie d'entrée pourrait s'avérer commune à plusieurs cellules de différentes origines.

Dans certaines conditions, la prise en charge de l'Ag chez *C. reinhardtii* peut se soustraire à l'applicabilité du MIL, c'est-à-dire que la prise en charge n'est pas proportionnelle à la concentration de métal libre. La présence de ligands inorganiques (Cl⁻, S₂O₃²⁻) a en effet accentué la prise en charge de l'Ag à une concentration de métal libre constante. Contrairement aux prédictions du MIL, le taux de prise en charge observé était quatre fois plus élevé lorsque la concentration de chlorure passait de 0 à 4 mM pour une force ionique et une concentration d'Ag⁺ constantes (respectivement 6 meq•L⁻¹ et 9 nM) alors qu'en présence de thiosulfate (0,11 μM), cet écart augmentait jusqu'à 20 fois la prise en charge observée en absence de ligands.

Dans le cas du chlorure, cette déviation du MIL n'est pas le résultat de la diffusion passive de l'espèce neutre AgCl⁰, tel que suggéré dans la littérature, mais reflète plutôt un contrôle diffusif de la prise en charge de l'Ag. De par son taux d'internalisation élevé, l'accumulation d'argent ne respecte pas les prédictions du MIL à des concentrations inférieures à ~ 10⁻⁷ M, soit jusqu'à ce que le flux diffusif de l'Ag à travers la couche non-mélangée séparant l'algue de son environnement excède le flux d'Ag à travers la membrane plasmique. Au-delà de cette concentration seuil, la limitation diffusive se dissipe et la prise en charge de l'Ag semble de moins en moins reliée à la concentration totale d'Ag. À notre connaissance, la démonstration que la prise en charge d'un élément non essentiel par un organisme aquatique peut être sous contrôle diffusif est une première.

Les concentrations naturelles d'Ag se retrouvent bien en-deçà de 10⁻⁷ M, ce qui suggère que la prise en charge d'Ag dans l'environnement serait toujours sous contrôle diffusif. Toutefois, l'applicabilité de ces observations à d'autres espèces d'algues ou même à d'autres organismes aquatiques reste à être démontrée et représente une avenue de recherche intéressante. Si la limitation de la prise en charge de l'Ag par la diffusion dans

la couche non-mélangée se révélait être un phénomène général, s'appliquant aux autres espèces aquatiques dans des conditions naturelles, alors il pourrait s'agir d'un argument important en faveur d'un critère de qualité de l'eau basé sur la concentration totale d'argent dissous.

D'autre part, il a été démontré qu'au-delà de cette concentration de 10^{-7} M, le thiosulfate peut stimuler de façon importante la prise en charge de l'Ag. En effet, en présence de thiosulfate, les complexes AgS_2O_3^- peuvent entrer dans les cellules par le transporteur de l'ion SO_4^{2-} . Ainsi, la prise en charge de ce complexe dépend de la concentration de sulfate présente dans le milieu d'exposition. Ces résultats mettent pour la première fois en évidence le transport accidentel d'un métal à travers un transporteur de substrat inorganique anionique. Finalement, il a été démontré que le complexe AgS_2O_3^- , une fois entré dans la cellule algale, peut contribuer à augmenter la toxicité de l'Ag.

L'implication environnementale de ces résultats dépendra de deux facteurs : (i) quelles sont les probabilités que des complexes argent-thiosulfate existent en milieu naturel; et (ii) à quel point ces systèmes de transport transmembranaire de sulfate / thiosulfate sont-ils généralisés chez les organismes aquatiques?

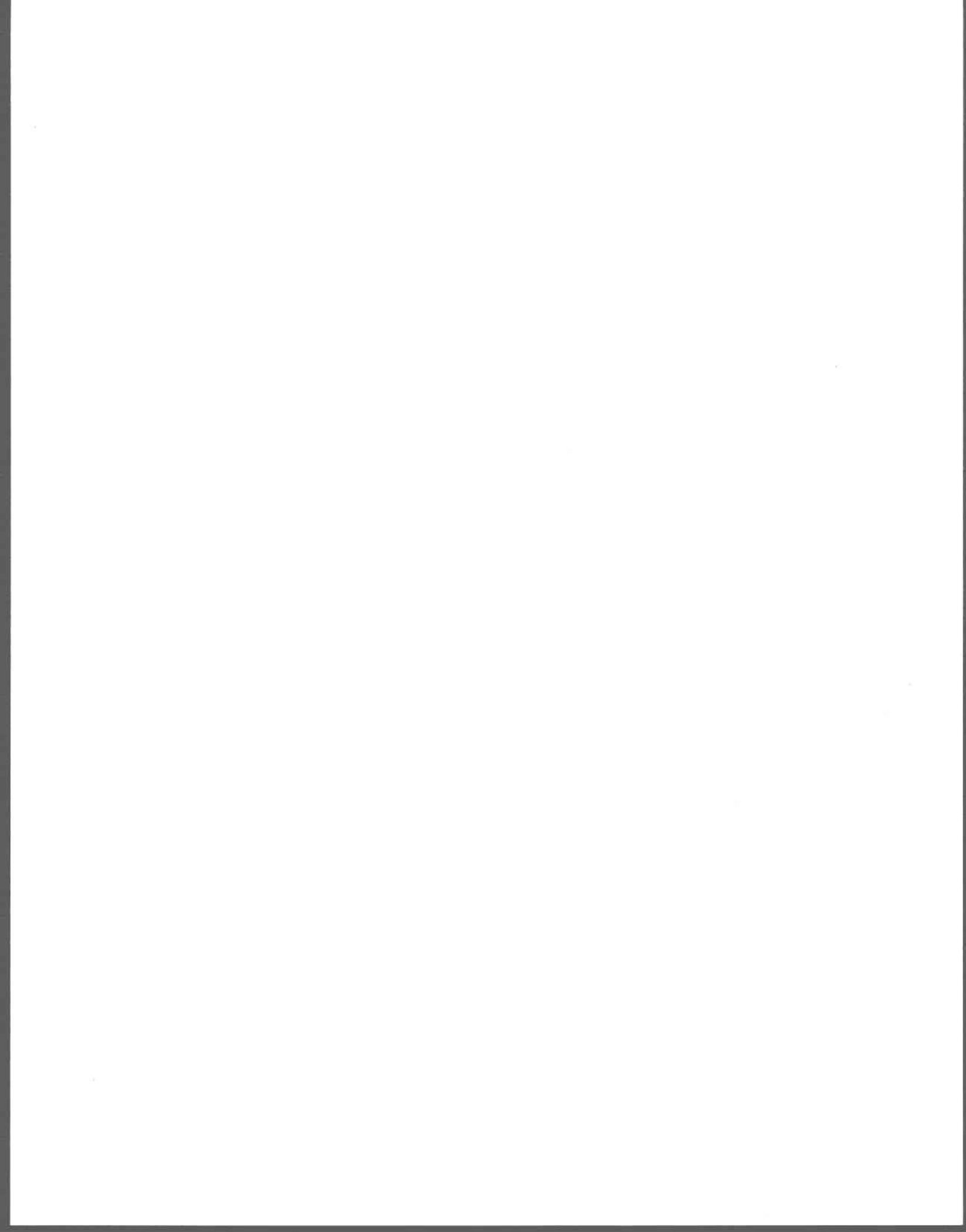
La spéciation de l'Ag en milieu naturel peut être fortement influencée par des ligands inorganiques simples (chlorure, thiosulfate), par des polysulfures et par des ligands organiques possédant des groupements thiol. De tous ces ligands, les espèces de soufre réduit représentent le plus grand potentiel de complexation de l'Ag. Si ces espèces de soufre réduit sont présentes et accessibles, on peut s'attendre à ce qu'elles dominent la spéciation de l'argent dissous (Adams et Kramer, 1998). Le thiosulfate ne serait pas en mesure d'entrer en compétition de façon efficace avec des espèces réduites de S(II) et les complexes argent-thiosulfate n'existeraient pas à des niveaux appréciables en milieu naturel. Si, toutefois, les espèces réduites de soufre sont, d'un point de vue cinétique, inertes (des résultats très récents laissent toutefois croire que ces échanges sont rapides; Rozan *et al.*, 2000), alors la probabilité que des complexes argent-thiosulfate puissent exister en milieu naturel devient plus grande.

En ce qui concerne le deuxième facteur, à savoir si les systèmes de transport transmembranaire de sulfate / thiosulfate sont généralisés chez les organismes aquatiques, il est certainement plausible que la prise en charge de complexes anioniques AgS_2O_3^- puisse être observée chez d'autres espèces d'algues ainsi que chez des bactéries possédant un tel système de transport de sulfate / thiosulfate. Il n'est cependant pas manifeste que de tels systèmes existent chez les organismes supérieurs (branchies, peau, intestin). Par exemple, chez les poissons, le transport du sulfate et du sulfite à travers les branchies est très peu documenté (Rosenthal, 1961; Bornancin *et al.*, 1980) mais des travaux plus récents tendent à lier la prise en charge du sulfate à la croissance des cartilages (Duan et Inui, 1990; McCormick *et al.*, 1992; Duan et Hirano, 1992; Duan *et al.*, 1992; Marchant et Moroz, 1993).

Déterminer la toxicité de l'Ag envers les algues représente un défi en soi. En effet, l'absence d'un fort ligand non métabolisable combinée à un taux de prise en charge très élevé rendent les résultats d'expériences traditionnelles en lots peu crédibles, sous-estimant la toxicité du métal. L'utilisation d'un turbidostat semble offrir une avenue prometteuse et le perfectionnement de cet outil pourrait s'avérer fort utile pour évaluer la toxicité de l'Ag ou d'autres métaux sur les cultures d'algues. Les résultats de toxicité chez *Chlamydomonas reinhardtii* confirment que l'argent est un métal des plus toxiques et mettent en évidence un effet délétère très rapide. En effet, la concentration d'Ag causant une inhibition de 50 % de la croissance de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* n'est que de 26 nM, et au-delà de cette concentration, une lyse des cellules est observable dans les heures qui suivent le pulse d'Ag. De plus, la présence de thiosulfate augmente la toxicité de l'Ag à concentration d'Ag⁺ égale. La stimulation de prise en charge observée précédemment semble donc entraîner une plus grande toxicité, contrairement à ce qui a déjà été observé chez des poissons.

Bien que ces concentrations (> ~ 1 nM) ayant un effet sur la croissance de l'algue *C. reinhardtii* soient relativement élevées par rapport à ce qui est relevé en milieux naturels (~ 10 pM), rien ne laisse croire que cette espèce soit la plus sensible à l'Ag. Toutefois,

l'effet de la forte complexation par les sulfures en milieu naturel sur la prise en charge et la toxicité de l'Ag demeure peu connue. L'étude de ces interactions Ag – S(II) – algues représente une suite logique à la présente recherche.



8. ANNEXE A : Spéciation de l'argent

8.1 Complexation par le chlorure et le thiosulfate

Plusieurs ligands peuvent influencer la spéciation chimique des métaux en milieu aquatique. Afin de familiariser le lecteur à la chimie de l'Ag, cette section contient quelques graphiques montrant les changements de spéciation dans les gammes de concentrations d'intérêt de chlorure et de thiosulfate. Ces graphiques ont été générés à l'aide du logiciel MINEQL+ à un pH de 7 et à une concentration totale de métal de 1 nM. À l'intérieur de la gamme de pH de travail (entre 5 et 7), la spéciation de l'Ag ne sera pas affectée par les variations de pH. La formation d'hydroxo-complexes et de carbonato-complexes d'Ag ne devient significative qu'à pH très basique (> 10).

Les constantes thermodynamiques utilisées sont incluses dans le logiciel et corrigées à l'aide d'une base de données personnalisée (mise à jour à l'aide d'une compilation d'un organisme américain, le *National Institute of Standards and Technology* : Martell *et al.*, 1998)⁴. Le tableau A.1 présente les principales constantes de formation et de solubilité utilisées.

Tableau A.1 : Constantes de formation et de solubilité de l'Ag utilisées pour effectuer les calculs de spéciation. Les valeurs ont été exprimées et corrigées selon les conventions d'utilisation de MINEQL+ (Fortin et Gauthier, 1995).

| Complexe | Log K | Complexe | Log K |
|---------------------------------|-------|---|-------|
| AgCl ⁰ | 3,31 | AgNO ₃ ⁰ | -0,10 |
| AgCl ₂ ⁻ | 5,25 | AgSO ₄ ⁻ | 1,30 |
| AgCl ₃ ²⁻ | 5,20 | AgS ₂ O ₃ ⁻ | 8,82 |
| AgCl ₄ ³⁻ | 5,51 | Ag(S ₂ O ₃) ₂ ³⁻ | 13,50 |
| AgCl _(s) | -9,75 | AgEDTA ³⁻ | 8,10 |

⁴ Mise à jour, disponible sur le site internet de l'INRS-Eau :
(<http://www.inrs-eau.quebec.ca/activites/groupe/biogeo/personal.htm>)

8.1.1 Chlorure

En absence de sulfures, le chlorure peut potentiellement contrôler la spéciation de l'Ag dans les milieux naturels où leur concentration est particulièrement élevée tels les estuaires et océans, mais aussi dans les eaux douces lorsque leur concentration atteint les 10^{-4} M (figure A.1). L'argent est d'ailleurs très peu soluble en présence de chlorure ($\log K_{sp} = -9,750$; tableau A.1).

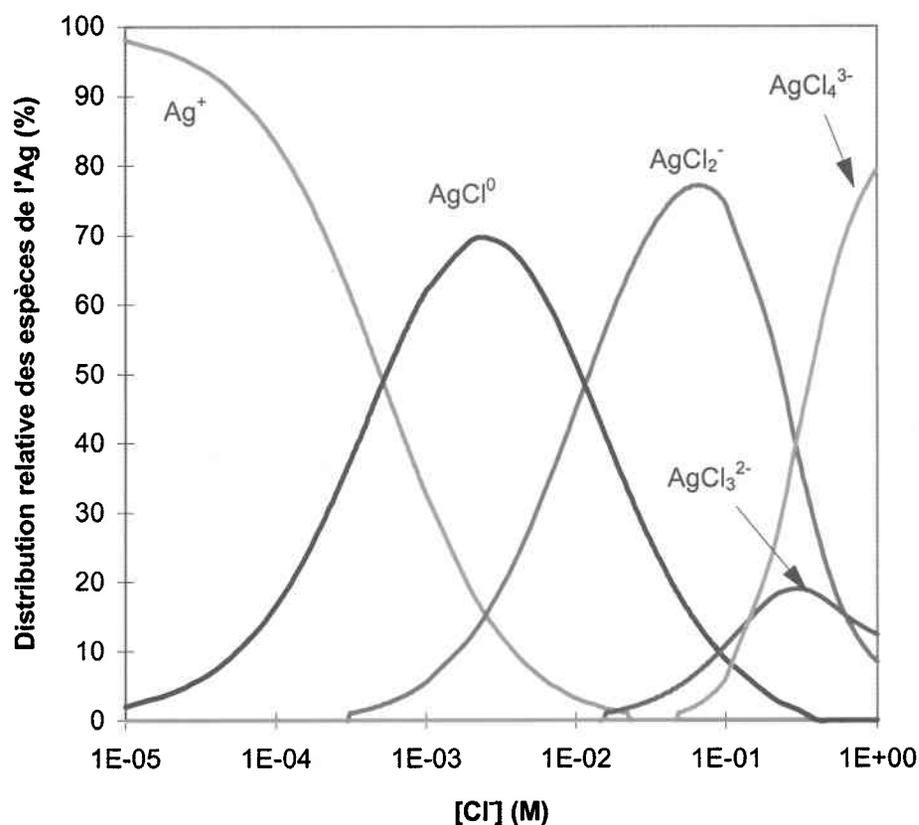


Figure A.1 : Spéciation de l'Ag selon la concentration de chlorure calculée à l'aide du logiciel MINEQL+.

8.1.2 Thiosulfate

Le thiosulfate, quant à lui, dominera la spéciation de l'Ag dans les eaux usées provenant des industries photographiques, ainsi que dans les rejets des laboratoires de développement photographique et dans les eaux usées provenant de tout endroit où l'on utilise la radiographie (cabinets de dentistes, hôpitaux). En effet, ce ligand est présent en

très grande concentration (de l'ordre du mM) dans le bain fixateur du procédé de développement photographique (Purcell et Peters, 1998). On retrouve également le thiosulfate dans les eaux interstitielles de sédiments (Luther *et al.*, 1986a, b; Thamdrup *et al.* 1994) et dans les eaux de drainage minier acide (Druschel *et al.*, 1999).

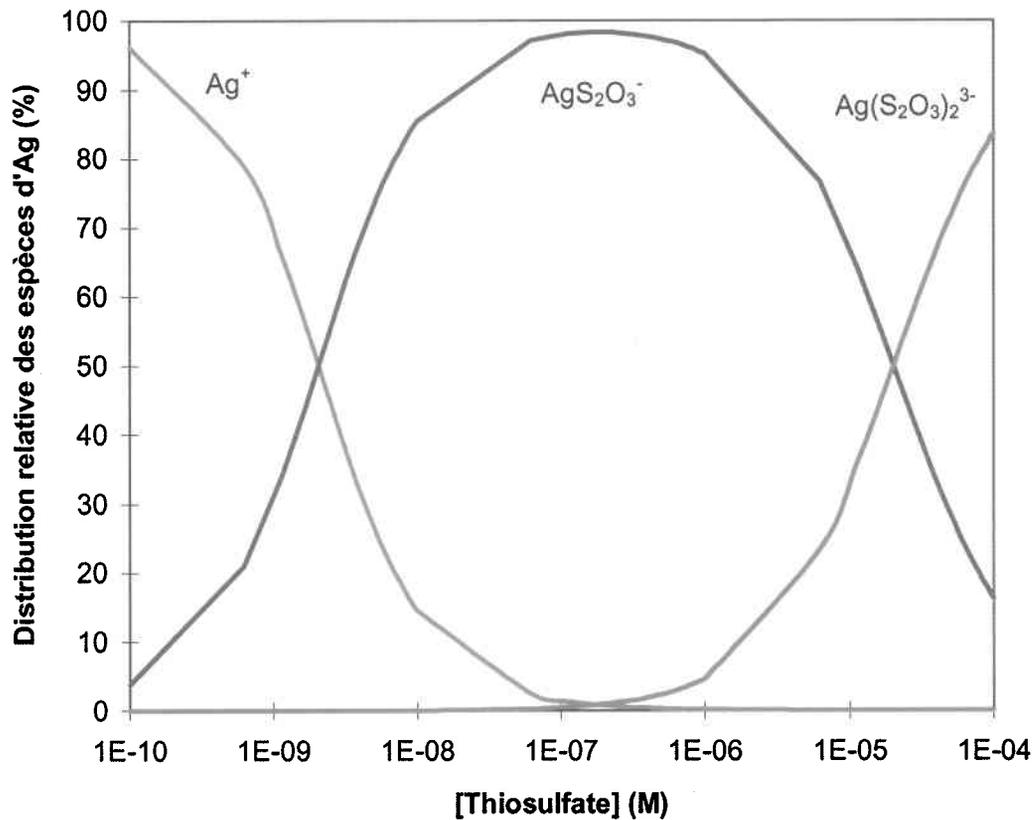


Figure A.2 : Spéciation de l'Ag selon la concentration de thiosulfate calculée à l'aide du logiciel MINEQL+.

8.2 Complexation par le sulfoxine

L'emploi du sulfoxine (8-hydroxyquinoline-5-sulfonate) comme ligand pour désorber l'Ag a été considéré (voir chapitre 2). Le sulfoxine est un ligand qui dénote une forte affinité pour certains métaux comme le Cd et le Pb (Phinney et Bruland, 1994; van Ginneken et Blust, 2000) et qui formerait un complexe hydrophile avec l'Ag⁺. L'affinité du sulfoxine pour l'Ag a été déterminée par titrage, à l'aide d'une électrode sélective à

l'argent (Orion), puisque aucune donnée thermodynamique n'était disponible pour les complexes Ag-sulfoxine dans la compilation du NIST (Martell *et al.*, 1998). La figure A.3 indique le domaine de linéarité (réponse Nernstienne) de l'électrode sélective.

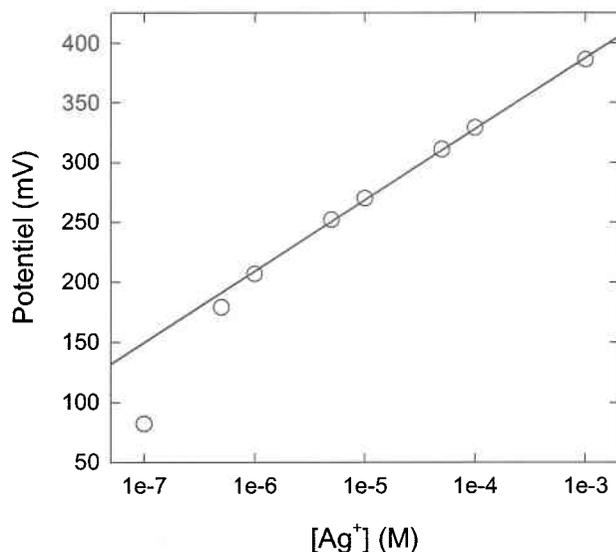


Figure A.3 : Calibrage de l'électrode sélective à l'ion Ag⁺ en fonction de la concentration d'Ag⁺.

Ainsi, la réponse de l'électrode est linéaire et la pente (59,4) correspond de très près à la pente Nernstienne (59,2) pour une concentration supérieure à 10⁻⁶ M Ag⁺, soit une concentration beaucoup plus élevée que la gamme de concentrations utilisée pour déterminer la prise en charge et la toxicité de l'Ag. Néanmoins, cet outil peut être utile pour déterminer la capacité de complexation de l'Ag d'un ligand en travaillant à des concentrations plus élevées. C'est ainsi que l'efficacité de complexation du sulfoxine (Sox) a été évaluée.



Figure A.4 : Structure moléculaire du sulfoxine.

Tableau A.2 : Concentrations d'Ag⁺ mesurées par électrode sélective en présence de sulfoxine à pH 7,0.

| [Sox] (mM) | [Ag] _T (μM) | [Ag ⁺] _{ise} (μM) |
|------------|------------------------|--|
| 0,01 | 1,00 | 0,88 |
| 0,10 | 1,00 | 0,84 |
| 1,00 | 1,00 | 0,41 |
| 0,01 | 10,0 | 9,7 |
| 0,10 | 10,0 | 9,3 |
| 1,00 | 10,0 | 4,8 |

D'abord, trois concentrations de sulfoxine ont été testées, soit 1, 10 et 100 mM en présence de 1 et 10 μM d'Ag à un pH de 7,0. Le taux de complexation maximal observé (tableau A.2) était de ~ 60 % lorsque le ratio Sox : Ag_T atteignait 1000. La constante conditionnelle de complexation est de 10^{3,2}.

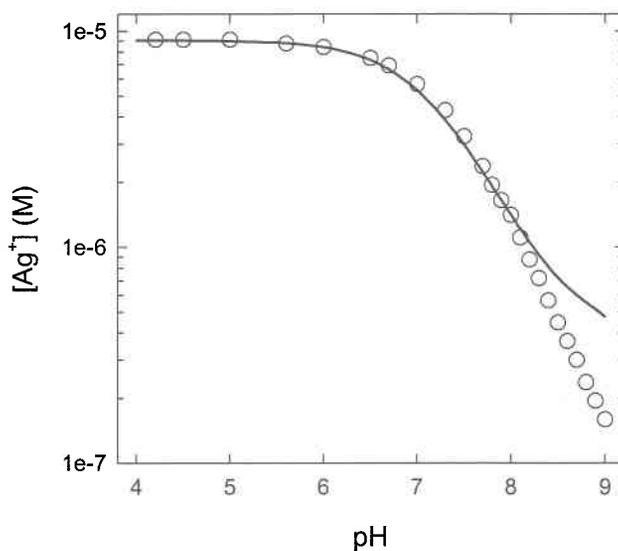


Figure A.5 : Effet du pH sur la complexation de l'Ag (9 μM) par le sulfoxine (1 mM), tel que mesuré par une électrode sélective à l'ion Ag⁺. La courbe représente la concentration d'Ag⁺ calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ en utilisant une constante de formation de 10^{4,7} pour le complexe AgSox.

Dans un deuxième temps, une solution contenant 9,1 μM d'Ag_T et 1,05 mM de Sox à un pH initial de 4,2 a été titrée avec une solution de NaOH 1,0 M. Le pK_a¹ du sulfoxine étant de 8,78, on pouvait s'attendre à ce que le pH ait un effet important sur la complexation de

l'Ag, surtout lorsqu'on approchait de cette valeur de 8,78. C'est en effet ce qui a été observé (figure A.5).

Ce titrage a permis de déterminer qu'il aurait fallu travailler à des concentrations de l'ordre du mM de sulfoxine et à un pH > 8 afin d'obtenir une complexation importante de l'Ag. De plus, l'affinité du sulfoxine pour le Ca et le Mg est suffisamment forte pour que la spéciation de ces cations soit affectée par la présence d'une telle concentration de sulfoxine, ce qui n'est pas souhaitable dans le cadre d'un rinçage des cellules pour désorber l'Ag lié à la surface. Comme le pH d'intérêt dans la présente étude est de 7, ces conditions se sont avérées inacceptables et l'emploi du sulfoxine comme agent de complexation a dû être écarté.

8.3 Complexation par le DIDS

Le DIDS (4,4'-diisothiocyantostilbene-2-2'-disulfonate; figure A.6) est couramment utilisé comme inhibiteur physiologique (Rybová *et al.*, 1988; Hirsch *et al.*, 1992; Spieß *et al.*, 1993 – voir annexe C).

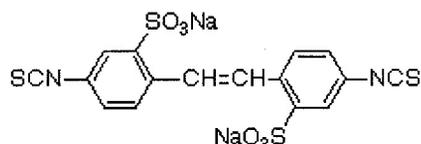


Figure A.6 : Structure moléculaire du DIDS

Tout comme dans le cas du sulfoxine, une électrode sélective a été utilisée afin de déterminer si cet inhibiteur peut complexer de façon significative l'Ag. En utilisant une concentration croissante de DIDS (0, 8, 16, 24 et 32 μM), la concentration d' Ag^+ a été mesurée en présence de 1 μM d' Ag_T à pH 7,0 (figure A.7).

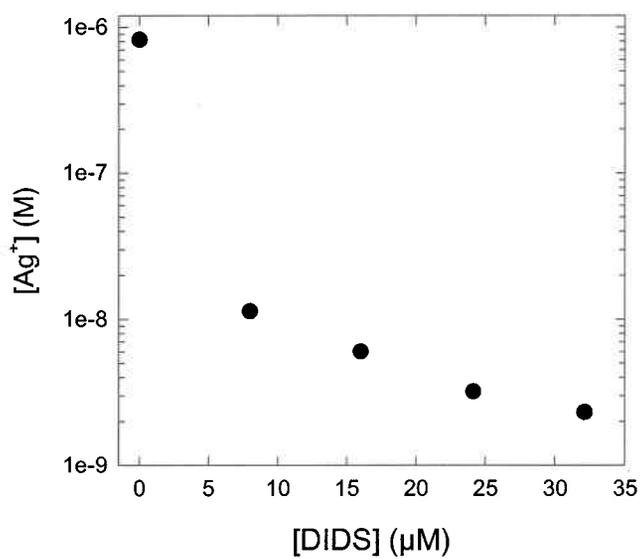


Figure A.7 : Effet de la concentration de l'inhibiteur DIDS sur la concentration d'Ag⁺ à concentration fixe d'Ag_T (1 μM) à pH 7,0, telle que mesurée à l'aide d'une électrode sélective.

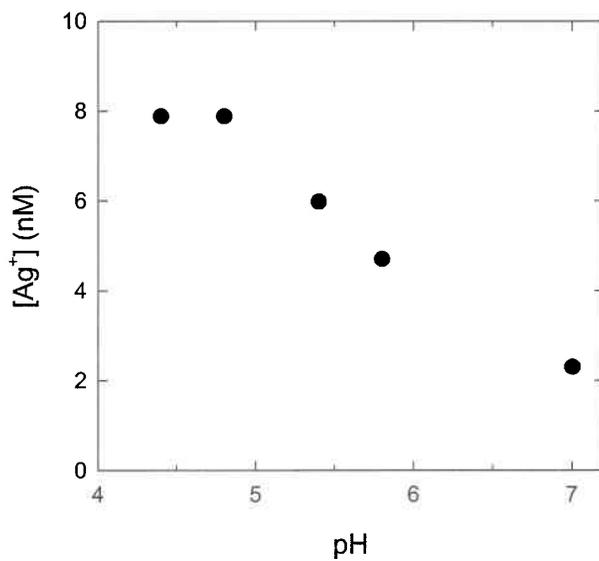


Figure A.8 : Effet du pH sur la concentration d'Ag⁺ en présence de 32 μM de DIDS et 1 μM d'Ag_T, telle que mesurée à l'aide d'une électrode sélective.

Le DIDS s'est avéré être un fort complexant pour l'Ag. En effet, suite à l'ajout de 8 μM de DIDS, seulement 1 % de l'Ag était sous la forme libre. Les ajouts subséquents ont également fait diminuer la proportion de métal libre. La constante conditionnelle de complexation de l'Ag par le DIDS dans ces conditions est de $7,01 \pm 0,05$. De plus, le pH a un effet important sur le taux de complexation (figure A.8), la concentration d'Ag⁺ augmentant d'un facteur 4 en passant d'un pH 7,0 à 4,5.

L'utilisation du DIDS comme inhibiteur physiologique (annexe C) en présence d'Ag est donc impraticable puisque la forte complexation de ce ligand ferait vraisemblablement varier la spéciation du métal dans le milieu d'exposition.

9. ANNEXE B : Effet de l'EDTA

9.1 Effet de l'EDTA sur les cellules algales (lors de la désorption des métaux)

Un rinçage des algues à l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA; 10^{-4} M) afin de désorber les métaux liés à la surface des algues peut potentiellement causer une lyse des cellules. Le radiomarquage au ^{14}C a été utilisé comme méthode de vérification de l'effet de l'EDTA sur l'intégrité des cellules. Les algues avec (WT) et sans (WL) paroi ont donc été radiomarquées à l'aide de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Amersham Canada; $628 \mu\text{Ci}\cdot\text{mg}^{-1}$), soit en ajoutant 250 nCi dans 500 mL ($9,3 \text{ nM } ^{14}\text{CO}_3$) à une densité cellulaire de $2500 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ lors de l'inoculation et ce dans deux milieux de cultures différents (MHSM-1 et MHSM-2; soit de faible et de haute force ionique). Lorsque la phase exponentielle de croissance des algues était atteinte, trois aliquots de 10 mL de solution étaient prélevés et filtrés à $2 \mu\text{m}$ (Poretics; polycarbonate). Ensuite, quatre rinçages de 10 mL avec et sans EDTA 10^{-4} M étaient effectués en parallèle sur chaque réplicat. Notons que cette concentration d'EDTA est suffisamment élevée pour complexer plus de 99 % du Mn, Zn ou Cd présent en solution (à condition bien sûr que la concentration d'EDTA soit en excès par rapport au métal) et que les concentrations de Ca et de Mg ont été ajustées afin de conserver une concentration constante de Ca^{2+} ($67 \mu\text{M}$) et de Mg^{2+} ($80 \mu\text{M}$). Les résultats obtenus apparaissent au tableau B.1.

Tableau B.1 : Activité en ^{14}C de *C. reinhardtii* avec (WT) et sans (WL) paroi retenues sur un filtre de $2,0 \mu\text{m}$. L'erreur représente l'écart-type sur trois mesures.

| Souche et milieu | Activité après rinçage avec EDTA (X 1000 DPM•cell. ⁻¹) | Activité après rinçage sans EDTA (X 1000 DPM•cell. ⁻¹) |
|------------------|--|--|
| WT MHSM-2 | $5,2 \pm 0,6$ | $5,4 \pm 0,3$ |
| WL MHSM-2 | $0,7 \pm 0,1$ | $0,6 \pm 0,1$ |
| WT MHSM-1 | $1,8 \pm 0,1$ | $2,0 \pm 0,1$ |
| WL MHSM-1 | $1,0 \pm 0,1$ | $0,8 \pm 0,2$ |

Si le rinçage à l'EDTA ne cause pas de lyse des cellules, aucune différence significative ne devait être observée entre l'activité après rinçage avec et sans EDTA. À l'opposé, une activité plus faible pour le groupe ayant subi un rinçage à l'EDTA devait survenir en cas d'éclatement des cellules (qui ne seraient pas retenues par le filtre). Or, dans les quatre cas, deux seulement montrent une activité plus faible pour le groupe rincé à l'EDTA et un seul affiche une différence significative (en trame grise; test de Student – $P < 0,05$), soit la souche avec paroi (WT) en milieu MHSM-1. Toutefois cette différence est très faible et, curieusement, indique une activité plus élevée pour les cellules ayant été rincées à l'EDTA. Afin de confirmer ou infirmer cette différence observée dans le milieu MHSM-1, la même expérience a été reprise, cette fois en doublant le nombre de répétitions (tableau B.2). Également, l'activité dans le filtrat a été mesurée afin de quantifier la part de débris organiques relargués en solution par les algues.

Tableau B.2 : Reprise de l'activité en ^{14}C de *C. reinhardtii* avec (WT) et sans (WL) paroi retenues sur un filtre de $2,0\ \mu\text{m}$. L'erreur représente l'écart-type sur six mesures.

| Souche et milieu | Activité après rinçage à l'EDTA (X 1000 DPM•cell. ⁻¹) | Activité après rinçage sans EDTA (X 1000 DPM•cell. ⁻¹) |
|------------------|---|--|
| WT MHSM-1 | $0,71 \pm 0,09$ | $0,73 \pm 0,07$ |
| WL MHSM-1 | $0,58 \pm 0,04$ | $0,50 \pm 0,06$ |

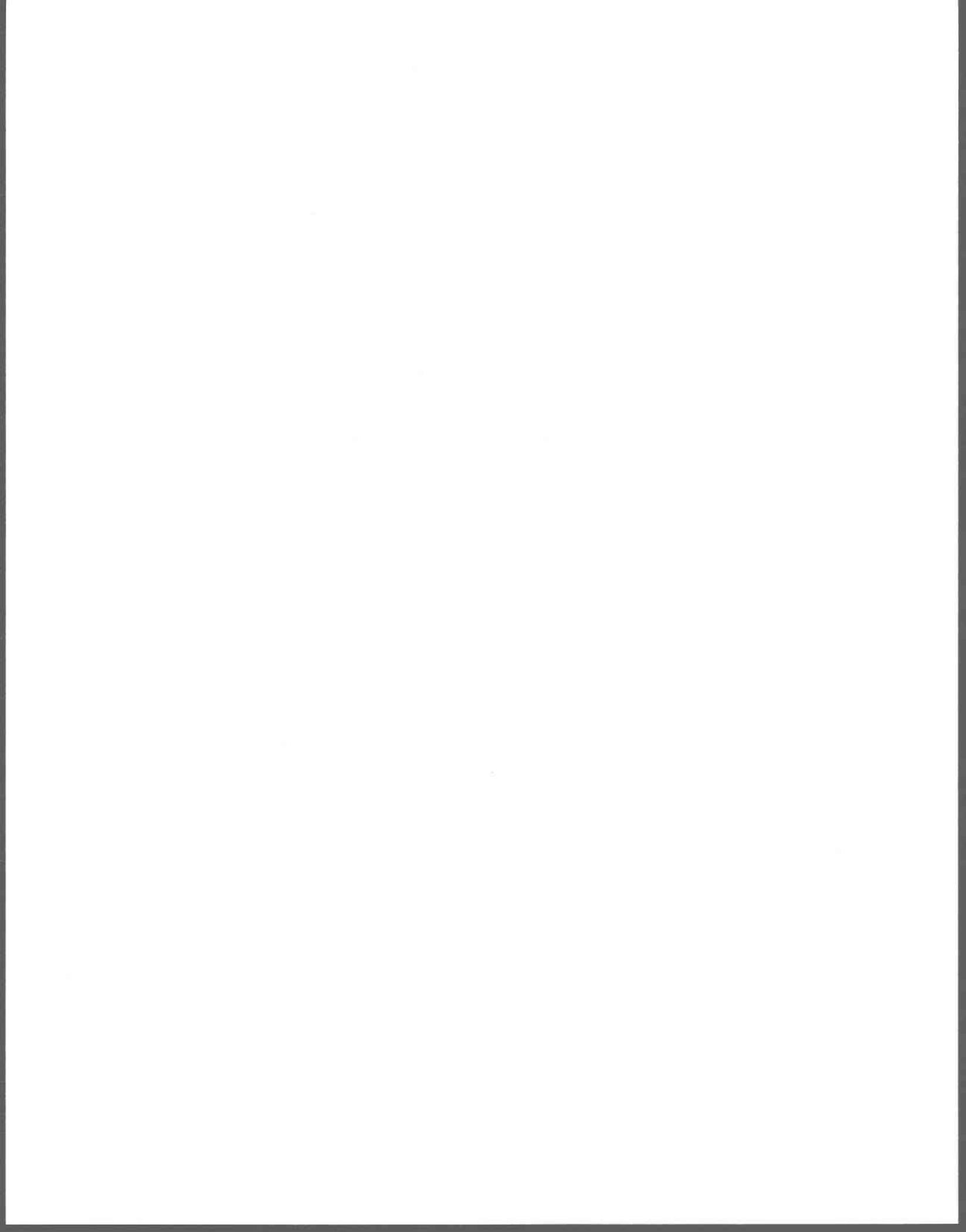
Les résultats n'indiquent cette fois aucune différence significative (test de Student – $P > 0,05$) entre les deux traitements. On peut donc conclure que le rinçage des algues à l'EDTA ($10^{-4}\ \text{M}$) ne cause pas de lyse des cellules. Également, la différence d'activité entre les deux milieux s'est rétrécie, et l'analyse du filtrat (acidifié et dégazé à l'azote) pour le ^{14}C en solution dans les fractions particulaire ($> 0,2\ \mu\text{m}$) et dissoute ($< 0,2\ \mu\text{m}$) a permis de retracer l'origine de cette différence (tableau B.3).

Ces résultats indiquent un bilan de masse similaire pour les deux souches de *C. reinhardtii*, mais avec une fraction importante de ^{14}C relarguée en solution par la souche

mutante (WL). En effet, la paroi cellulaire de cette souche d'algue n'adhère pas à sa membrane, celle-ci demeure en solution (fraction 0,2 – 2 µm) et se dégrade probablement avec le temps, contribuant aussi à la phase dissoute observée (fraction < 0,2 µm) pour cette souche.

Tableau B.3 : Moyenne d'activité tous traitements confondus (X 1000 DPM•cell.⁻¹).

| Fraction | WT | WL |
|------------|------|------|
| > 2 µm | 0,72 | 0,54 |
| 0,2 – 2 µm | 0,08 | 0,39 |
| < 0,2 µm | 0,03 | 0,15 |
| TOTAL | 0,8 | 1,1 |



10. ANNEXE C : Transport du chlorure

10.1 Introduction

Afin de vérifier l'hypothèse d'une prise en charge de l'argent à travers un système de transport de chlorure, le transport du chlorure et l'inhibition du transporteur ont été étudiés. L'utilisation d'inhibiteurs physiologiques de prise en charge du chlorure aurait pu être utile pour déterminer si les complexes AgCl_n^{1-n} utilisent réellement un transporteur anionique.

Trois inhibiteurs physiologiques ont été testés dans le but de supprimer le transport de chlorure à travers la membrane plasmique. Ces inhibiteurs sont : i) le DCMU (3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurée); ii) le DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2-2'-disulfonate); et iii) l'A-9-C (acide anthracène-9-carboxylique).

Le DCMU est un inhibiteur du photosystème II (figure C.1). Ainsi, si la prise en charge du Cl est reliée à la photosynthèse, le DCMU inhibera ce transport. Plusieurs auteurs ont observé une atténuation dans la prise en charge de Cl^- en absence de lumière chez les algues (Raven, 1976; Aparicio *et al.*, 1994; Quiñones *et al.*, 1997). La vitesse de transport du chlorure chez la cyanobactérie *Anacystis nidulans* (Craig et Budd, 1979) ainsi que chez l'algue verte *Dunaliella acidophila* (Hirsch *et al.*, 1992) était environ deux fois inférieure en absence plutôt qu'en présence de lumière. L'importance de la lumière indique que la photosynthèse est importante dans la régulation de l'entrée du Cl^- , ce qui laisse présager un effet inhibiteur du DCMU tel que l'on observé Craig et Budd (1979). Toutefois, Thaler *et al.* (1992) ont observé le phénomène inverse, soit une augmentation du taux d'entrée du chlorure dans l'obscurité ou en présence de DCMU chez l'algue verte *Eremosphaera viridis*.

Il est également possible d'utiliser un inhibiteur physiologique tel que le DIDS (figure A.6) pour inhiber le transport du chlorure (Hirsch *et al.*, 1992; Spieß *et al.*, 1993). Le DIDS est un inhibiteur spécifique aux transporteurs anioniques qui forme des liens

covalents irréversibles avec la surface membranaire (Spieß *et al.*, 1993; Koettters *et al.*, 1995). Finalement, l'A-9-C (figure C.1) agit en court-circuitant les canaux à chlorure (*anion channel blocker*; Hirsch *et al.*, 1992).

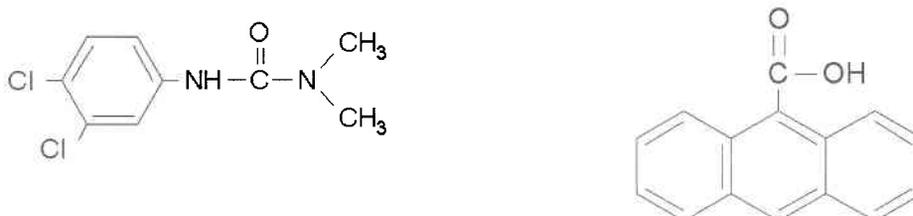


Figure C.1 : Structure moléculaire du DCMU (à gauche) et de l'A-9-C (à droite).

10.2 Méthodologie

La prise en charge du chlorure était déterminée à l'aide d'un radio-isotope (^{36}Cl ; Amersham Canada; $13,3 \mu\text{Ci}\cdot\text{mg}^{-1}$). La densité cellulaire ($20\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$) et le volume de solution (100 mL) ont été doublés par rapport à ceux utilisés pour les mesures de prise en charge de l'Ag, afin d'obtenir un signal suffisamment élevé sur le compteur β . La concentration finale de chlorure ainsi que le pH étaient respectivement de $10,4 \mu\text{M}$ et de 7,0 dans toutes les expériences et le nombre de réplicats était de trois. Après 33 minutes d'exposition, les cellules étaient récoltées et rincées avec le milieu MHSM-1 simplifié ($4 \times 10 \text{ mL}$) afin de se débarrasser du ^{36}Cl résiduel. Notons que dans le cas d'un anion, l'adsorption à la surface des algues n'est pas à craindre puisque celle-ci est chargée négativement.

Étant donné que le DIDS est photo-sensible (Spieß *et al.*, 1993), toutes les expositions impliquant cet inhibiteur ont été réalisées dans l'obscurité alors que les autres expériences ont été réalisées en présence de lumière ($\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). De plus, afin de laisser le temps à l'inhibiteur d'avoir un effet sur l'algue, les cellules ont toutes été pré-incubées pendant au moins une heure en présence des inhibiteurs avant d'ajouter le traceur (^{36}Cl). Dans une première expérience d'inhibition, la prise en charge de $^{36}\text{Cl}^-$ a été mesurée en présence de $100 \mu\text{M}$ de DIDS. De plus, l'effet d'inhibition d'une pré-exposition

seulement dans un milieu contenant une même concentration de DIDS a également été mesuré. Suite à une pré-incubation d'une heure en présence de DIDS, les cellules ont été récoltées, rincées et resuspendues dans le milieu contenant le $^{36}\text{Cl}^-$ mais en absence de DIDS. Finalement, l'effet du DCMU (10 μM) sur la prise en charge de chlorure a été évalué et comparé à la prise en charge normale en présence de lumière.

Lors d'une deuxième expérience, l'effet de l'A-9-C (100 μM) sur la prise en charge du chlorure a été comparé à la prise en charge normale (témoin). La prise en charge du chlorure par des cellules pré-exposées à l'A-9-C (100 μM) et au DIDS (à une concentration supérieure à l'expérience précédente : 350 vs 100 μM) a également été mesurée.

L'effet inhibiteur du DIDS a ensuite été caractérisé en fonction de sa concentration. Une exposition témoin en présence de lumière a servi de point de référence aux expositions réalisées dans l'obscurité. Ainsi, la prise en charge de $^{36}\text{Cl}^-$ a été mesurée en présence de 0, 10 et 50 μM de DIDS.

10.3 Résultats

La prise en charge du chlorure s'est avérée être insensible à la présence de DCMU (10 μM), avec un taux de prise en charge de $2,10 \pm 0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ par rapport à une accumulation de $^{36}\text{Cl}^-$ de $2,1 \pm 0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ pour le témoin (figure C.2; test de Student; $P > 0,05$). En revanche, la présence de 100 μM de DIDS a eu un effet important sur l'internalisation du chlorure. L'exposition des algues au DIDS simultanément au $^{36}\text{Cl}^-$ a révélé une inhibition presque complète du transport de Cl^- ($0,09 \pm 0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, soit seulement $5 \pm 2 \%$ de la prise en charge de Cl^- par le témoin; figure C.2). Toutefois, lorsque les algues sont seulement mises en contact avec le DIDS avant d'être exposées au traceur, l'efficacité de l'inhibiteur est moindre, résultant en une accumulation de $1,16 \pm 0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.

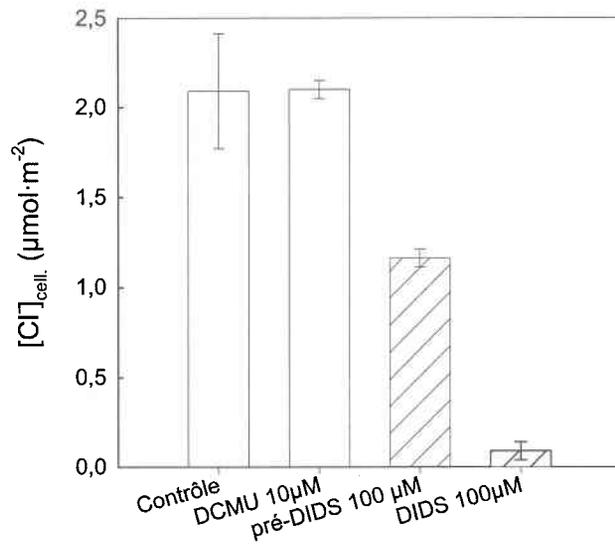


Figure C.2 : Effet du DCMU et du DIDS (en prétraitement seulement ou exposition conjointe au Cl⁻) sur la prise en charge du ³⁶Cl⁻ après 33 minutes. Les colonnes hachurées représentent les expériences réalisées dans l'obscurité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

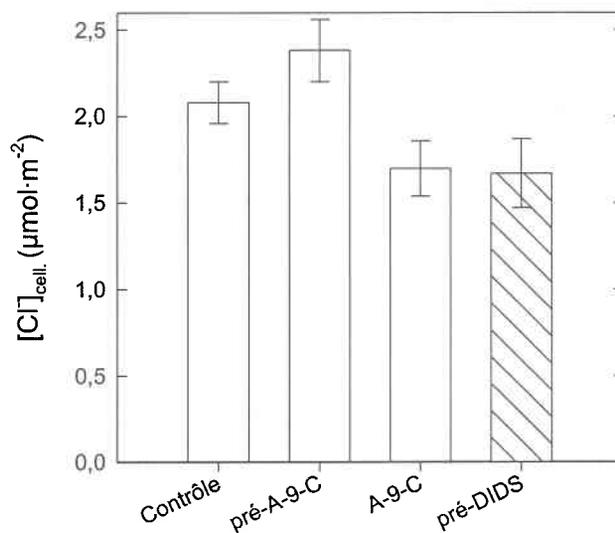


Figure C.3 : Effet de l'A-9-C et du pré-traitement des cellules à l'A-9-C (100 μM) ou au DIDS (350 μM) sur la prise en charge du chlorure. La colonne hachurée représente une expérience réalisée dans l'obscurité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

Comme en témoigne la figure C.3, le bloqueur de canaux A-9-C n'a pas eu d'effet significatif sur la prise en charge du chlorure lorsque les cellules ne sont que pré-exposées à l'A-9-C (test de Student; $P > 0,05$). Toutefois, lorsque l'A-9-C est présent lors de l'ajout du $^{36}\text{Cl}^-$, le transport est faiblement mais significativement réduit de 18 % (test de Student; $P < 0,05$). De même, le prétraitement au DIDS a également diminué significativement l'accumulation de Cl^- (test de Student; $P < 0,05$) mais, étonnamment, de manière moins marquée que lors de l'expérience précédente pourtant réalisée à une concentration plus faible.

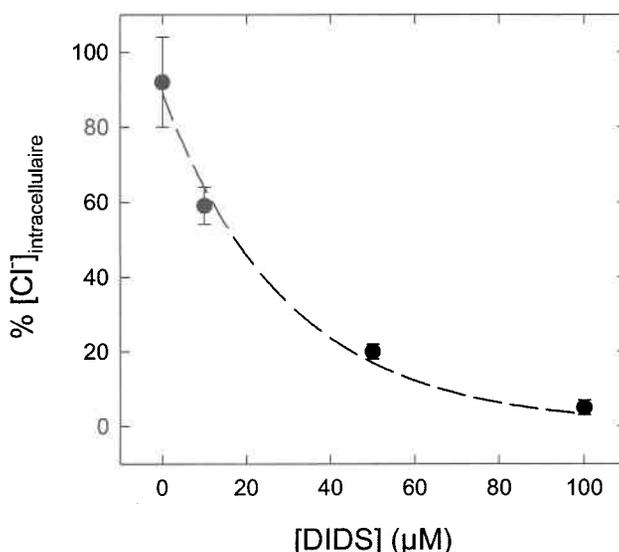


Figure C.4 : Effet relatif de la concentration de DIDS ajoutée dans l'obscurité sur la prise en charge du chlorure ($t = 33$ min) par rapport au témoin à la lumière. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. La prise en charge de chlorure à $100 \mu\text{M}$ DIDS est tirée de la figure C.2.

L'effet du DIDS sur l'accumulation de Cl^- est présenté à la figure C.4. Le taux de prise en charge du chlorure mesuré après 33 minutes en présence de lumière était de $1,8 \pm 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ($55 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). En absence de lumière (après une heure de pré-incubation à la noirceur), ce taux passe à $1,7 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ (non significatif : test de Student; $P > 0,05$). Toutefois, en présence de 10 et $50 \mu\text{M}$ de DIDS, la prise en charge de Cl^- est graduellement inhibée, avec des accumulations respectives de $1,06 \pm 0,06$ et $0,37 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.

10.4 Discussion

Ces expériences sont révélatrices à de nombreux égards. Tout d'abord, le peu d'effet de l'A-9-C (figure C.3) sur le transport du chlorure, contrairement à ce qui a été observé pour le DIDS (figures C.2 et C.4), suggère que le chlorure est internalisé principalement par un transporteur protéique plutôt que par un canal (la présence de canaux ayant été évoquée chez certaines algues marines; Hedrich, 1994). Notons d'ailleurs que le transport de Cl⁻ se fait contre le gradient de concentration (transport actif; Raven, 1980). À une concentration de 100 µM d'A-9-C, Hirsch *et al.* (1992) ont observé une inhibition d'environ 50 % du transport de Cl⁻ chez l'algue verte *Dunaliella acidophila*, mais également une inhibition de la photosynthèse. Comme la prise en charge du chlorure chez cette algue était fortement dépendante de la lumière, il y a lieu de croire que l'A-9-C avait un effet indirect (sur la photosynthèse) plutôt que direct (par blocage des canaux). Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*, le transport de Cl⁻ semble insensible à la lumière (figure C.4; comparer la prise en charge à 0 µM de DIDS à la valeur de référence), ce qui est confirmé par l'absence d'effet du DCMU (10 µM), un inhibiteur du photosystème II. Cette insensibilité suggère donc que l'internalisation du chlorure n'est pas intimement reliée à la photosynthèse chez *C. reinhardtii*.

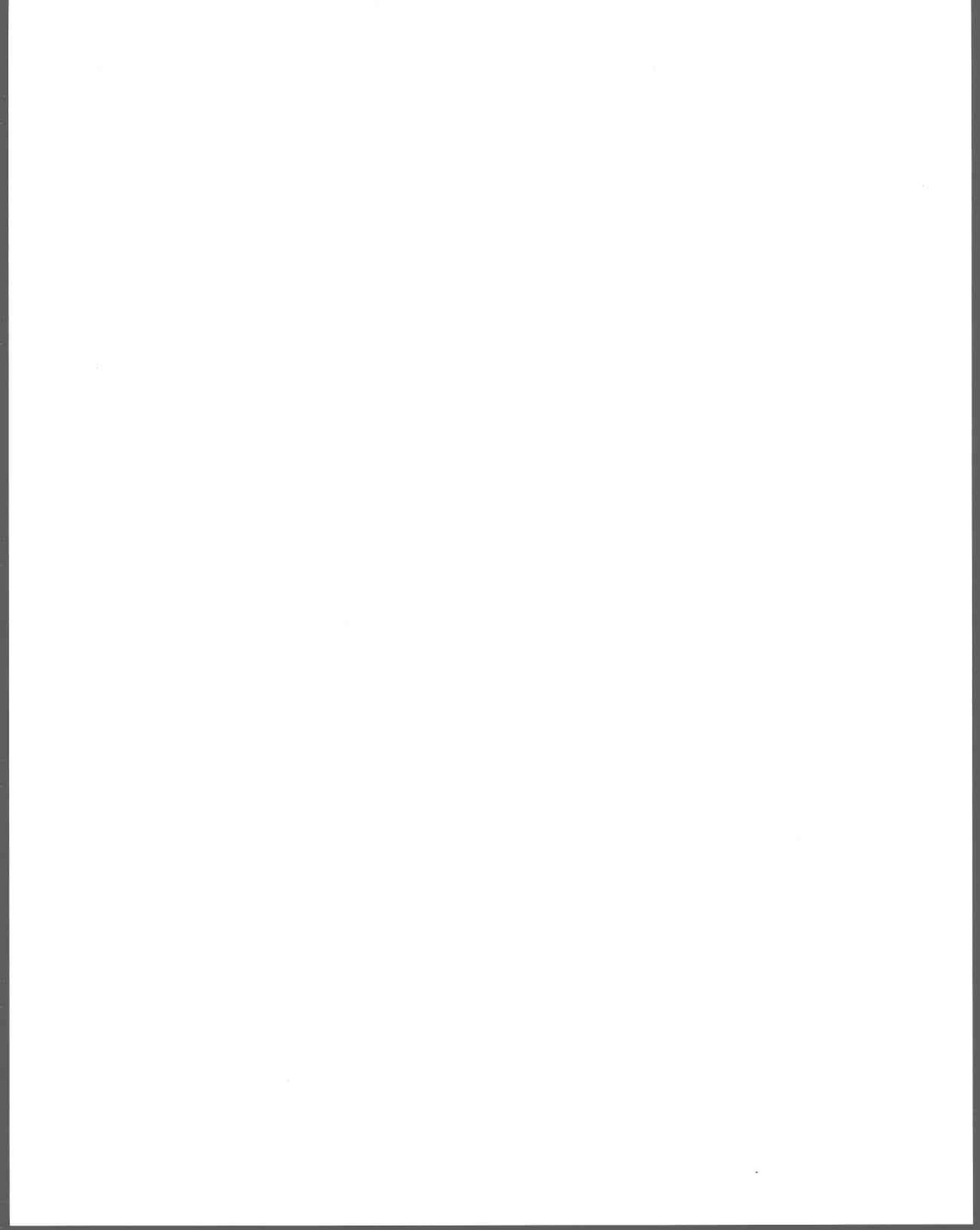
L'effet du DIDS, contrairement à ce qui a été observé avec des cellules animales (Koettters *et al.*, 1995), semble partiellement réversible. En effet, la pré-incubation des cellules en présence de 100 (figure C.2) ou de 350 µM (figure C.3) n'a pas permis de conserver l'inhibiteur en place, comme le suggèrent les taux de prise en charge de Cl⁻ observés lorsque comparés à ceux obtenus en exposant les cellules à l'inhibiteur et au traceur conjointement. Curieusement, l'inhibition a été plus forte à 100 µM qu'à 350 µM de DIDS, ce qui laisse croire que l'étape de rinçage des algues, lors de la récolte, a un effet important sur la désorption de l'inhibiteur. Cette réversibilité semble d'ailleurs spécifique aux algues (Sanders, 1984; Spieß *et al.*, 1993).

La concentration de DIDS nécessaire pour inhiber 50 % de la prise en charge du chlorure chez *C. reinhardtii* est de 19 µM. Cette valeur est légèrement inférieure à celles obtenues

par Spieß *et al.* (1993) et par Hirsch *et al.* (1992), soit respectivement 40 μM chez l'algue marine géante *Valonia utricularis* et ~ 110 μM chez l'algue verte acidophile *Dunaliella acidophila*.

10.5 Conclusion

Contrairement à ce qui a été recensé dans la littérature, le transport de chlorure chez *C. reinhardtii* ne semble pas être relié de façon importante à la photosynthèse. En effet, l'obscurité tout comme l'ajout de DCMU n'a pas eu d'effet significatif sur les taux de transport du $^{36}\text{Cl}^-$. De plus, l'inefficacité du A-9-C suggère que le chlorure est principalement transporté par une protéine transmembranaire, sensible au DIDS. Le DIDS s'est, en effet, avéré être un excellent inhibiteur de transport du Cl^- avec une inhibition de 95 % à une concentration de 100 μM . Cependant, contrairement à ce qu'on peut observer sur des cellules animales, le DIDS ne semble pas former de liaisons covalentes irréversibles avec la surface membranaire des algues.



11. ANNEXE D : Transport du sulfate

Étant donné le rôle primordial du S dans le métabolisme des cellules, le transport du sulfate, contrairement au transport du Cl, a fait l'objet de nombreuses études. Le soufre fait partie des macronutriments essentiels à la croissance des algues et les sulfates, la forme la plus abondante de S en milieu oxygène, sont la principale source de soufre. Toutefois, d'autres formes chimiques du soufre, telles que des formes réduites ou des acides aminés (ex. cystéine et méthionine), peuvent être assimilés. Une grande partie des besoins en soufre est destinée à la synthèse de protéines et / ou à la production de sulfolipides. On attribue également au soufre un rôle dans la division cellulaire (O'Kelley, 1974). La composition élémentaire de *Chlorella* et *Euglena* indique que le contenu en S varie entre 0,3 et 1,5 % du contenu en carbone de ces algues (Raven, 1980).

11.1 Cinétique

Plusieurs chercheurs ont étudié le transport des sulfates chez les bactéries au cours des années 50 et 60, mais ce ne fut que vers la fin de cette dernière décennie qu'est apparu un intérêt pour ce phénomène chez les algues. Parmi les premiers à étudier en détails la cinétique de transport des sulfates chez les algues, Vallée et Jeanjean (1968a, b) ont concentré leurs travaux sur *Chlorella pyrenoidosa*. Les cellules étaient pré-incubées dans un milieu sans sulfate pendant 2,5 à 30 heures, puis le taux de prise en charge était mesuré à l'aide de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Pour des cellules carencées pendant plus de deux heures, le K_m était de 1,2 μM . Entre autres observations, les travaux de Vallée et Jeanjean (1968a, b) ont démontré que les taux de prise en charge de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ augmentent avec le temps de pré-incubation (0,5 à 48 heures) dans un milieu sans sulfate. Lors des deux premières heures de carence, la stimulation de la prise en charge (telle que mesurée sur des cellules resuspendues dans un milieu expérimental contenant du sulfate) était très rapide, suivie d'une période d'augmentation moins prononcée pour finalement atteindre un plateau après environ 20 heures de carence. Également, suite à une carence de 24 heures, la vitesse d'absorption des sulfates diminuait grandement avec le temps de resuspension dans un milieu contenant suffisamment de SO_4^{2-} (10^{-4} M). Ces deux dernières

observations (1968a), conjuguées à celle d'une relation inverse apparente entre les taux de prise en charge et la concentration intracellulaire de S (1968b), témoignent de la présence d'un système de régulation de l'entrée des sulfates.

Le même type d'observation a été obtenu pour *Monoraphidium braunii* et *Chlamydomonas reinhardtii*, pour qui la prise en charge de sulfates augmente avec le temps de pré-incubation dans un milieu carencé en S (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992; 1998). Ces résultats indiquent une prise en charge très rapide, en moins d'une minute, dans les premiers instants de contact avec le sulfate, suivie d'une augmentation de la prise en charge ayant une pente beaucoup moins abrupte. Yildiz *et al.* (1994) ont été en mesure d'obtenir des valeurs de prise en charge par *Chlamydomonas reinhardtii* sur une échelle de secondes, indiquant une accumulation linéaire dans les quatre premières minutes. Les taux initiaux de prise en charge du sulfate (30 μM) par des cellules carencées étaient 25 fois plus élevés. Une différence dans les taux de prise en charge initiale était décelable après une heure de privation et ces taux semblaient atteindre un plateau après six heures. Ces changements se produisaient encore plus rapidement chez *Chlorella ellipsoidea* pour qui la prise en charge était stimulée en moins de 15 minutes après le transfert des cellules dans un milieu sans sulfates pour atteindre un plateau après trois heures. Après cinq heures de privation, le taux de prise en charge du sulfate était de 10 fois supérieur (Matsuda et Colman, 1995).

La constante de demi-saturation pour le sulfate, K_m , peut varier d'une espèce à l'autre. Pour *Monoraphidium braunii*, cette constante est de 5 μM alors que pour *Hydrodictyon reticulatum*, cette constante est d'environ 80 μM (Rybová *et al.*, 1988; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Gimmler et Weiss (1987) ont étudié l'effet d'un surplus ou d'un manque de sulfates sur *Dunaliella parva*, une algue tolérante à des concentrations extrêmement élevées de sulfates (jusqu'à 500 mM). En présence de 24 mM SO_4^{2-} , le K_m obtenu est de 170 μM ; il n'y a toutefois pas suffisamment de données dans cette étude pour faire la comparaison avec des cellules carencées, mais leurs mesures de prise en charge indiquent une diminution lorsque la concentration de sulfates augmente dans le milieu de pré-exposition, ce qui est cohérent avec les résultats mentionnés plus haut.

De façon générale, les cellules pré-incubées dans un milieu carencé auront des K_m beaucoup plus faibles que celles cultivées dans un milieu riche en sulfates alors que les V_{max} seront sensiblement plus élevées. Ainsi, Vallée et Jeanjean (1968a) ont remarqué peu de changement dans l'affinité du transporteur ($K_m \approx 1 \mu\text{M}$) que les cellules soient carencées pendant 2,5 ou 30 heures alors que la vitesse maximale de prise en charge, V_{max} , grimpeait de 550 à 2300 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$. Toutefois, une différence d'affinité du système de transport entre cellules carencées et replettes en sulfates a été observée par quelques chercheurs. Le K_m du sulfate chez *Chlorella ellipsoidea* passait de 60 à 17 μM alors que V_{max} passait de 100 à 450 $\text{fmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl lorsque les cellules étaient carencées en sulfate pendant 5 h (Matsuda et Colman, 1995). Même observation chez *Chlamydomonas reinhardtii* où le K_m diminuait de 17 à 2 μM alors que le V_{max} augmentait de 21 à 206 $\text{fmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 10^{-5}$ cell. suite à une carence de 5 h (Yildiz *et al.*, 1994;). D'autres auteurs ayant également utilisé *Chlamydomonas reinhardtii* contestent l'interprétation de Yildiz *et al.* (1994), des courbes de cinétique alléguant la présence d'un système de transport biphasique, plutôt que monophasique, chez les algues non carencées (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). En effet, une inspection visuelle du graphique de type Eadie-Hofstee pour les cellules carencées (cf. figure 2B; Yildiz *et al.*, 1994) indique une cinétique de transport biphasique ayant des K_m approximatifs de 7 et 36 μM (plutôt qu'un K_m unique de 17 μM); c'est ce que Pérez-Castiñeira *et al.* (1998) ont démontré en obtenant respectivement des K_m de 1 et 50 μM et des V_{max} de 0,030 et 0,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl, pour la même espèce d'algue, et ce en milieu non carencé. Ces observations suggèrent que le système de haute affinité est déjà présent chez cette algue verte avant la carence. La présence de plusieurs phases n'est peut-être pas toujours détectée, selon la gamme de concentrations de sulfates choisie par l'expérimentateur. Ainsi, chez *Hydrodictyon reticulatum*, on a observé la présence d'un système biphasique, sans toutefois être en mesure de calculer deux K_m (Rybová *et al.* 1988). Seuls Biedlingmaier et Schmidt (1989) ont démontré un système triphasique possédant des K_m de 13, 39 et 280 μM chez *Chlorella fusca*. C'est également l'étude où la gamme de concentration de sulfate est la plus large, de 10^{-6} à 10^{-2} M, et qui indique un profil d'accumulation atypique pour des cellules carencées (ce phénomène pourrait être causé

par une cinétique très rapide conjuguée à un temps d'exposition trop long, de 15 minutes). Le tableau D.1 présente une compilation de toutes les constantes de demi-saturation recensées dans la présente annexe.

Tableau D.1 : Tableau récapitulatif des constantes de demi-saturation (K_m) publiées selon les conditions de culture des cellules (temps de carence ou $[SO_4^{2-}]$) et l'espèce utilisée.

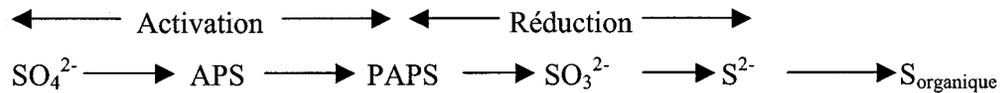
| <i>Espèce</i> | K_m (μM) | Carence (t ou $[SO_4]$) | Référence |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <i>C. pyrenoidosa</i> | 1,2 | Oui (2,5-30 heures) | Vallée et Jeanjean, 1968a |
| <i>H. reticulatum</i> | 80 ^a | Oui (temps inconnu) | Rybová <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>D. parva</i> | 170 ^b | Non (24 mM ^c) | Gimmler et Weiss, 1987 |
| <i>C. fusca</i> | 13 / 39 / 280 ^d | Non (0,30 mM) | Biedlingmaier et Schmidt, 1989 |
| <i>C. reinhardtii</i> | 2 | Oui (5 heures) | Yildiz <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>C. reinhardtii</i> | 17 | Non (conc. inconnue) | Yildiz <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>C. ellipsoidea</i> | 17 | Oui (5 heures) | Matsuda et Colman, 1995 |
| <i>C. ellipsoidea</i> | 60 | Non (0,35 mM) | Matsuda et Colman, 1995 |
| <i>C. reinhardtii</i> | 1 / 50 ^a | Non (0,30 mM) | Pérez-Castiñeira <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>M. braunii</i> | 5 | Non (1 mM) | Pérez-Castiñeira <i>et al.</i> , 1998 |

a Transport biphasique; b Valeur calculée par CF; c Correspond à la concentration interne de cette algue; d Transport triphasique

11.2 Voie métabolique et destin du sulfate

Les travaux de Vallée et Jeanjean (1968a) ont permis d'établir que le sulfate internalisé n'était pas échangeable avec le milieu ambiant, du moins sur une courte échelle de temps (~ 30 minutes). Cet aspect a été étudié plus en détail par Rybová *et al.* (1988) qui ont mesuré la sortie de ^{35}S dans le temps pour l'algue *Hydrodictyon reticulatum*. Ces taux atteignaient ~ 10 % du S intracellulaire après une heure pour ensuite demeurer à ce niveau ou diminuer lentement selon le pH du milieu. La spéciation intracellulaire du soufre a également fait l'objet de recherches et de toutes les formes chimiques du soufre présentes à l'intérieur des cellules, le sulfate semble être l'espèce dominante (Vallée et Jeanjean, 1968a; Hodson et Schiff, 1971; et Rybová *et al.* 1988).

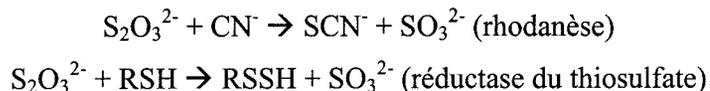
Vallée et Jeanjean (1968b) ont proposé le modèle suivant comme voie métabolique principale du sulfate chez *Chlorella pyrenoidosa* :



où : APS = adénosine 5'-phosphosulfate

PAPS = 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

Hodson et Schiff (1971) ont toutefois démontré, à l'aide d'extraits de plusieurs espèces d'algues (*Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Anacystis sp.* et *Chlamydomonas reinhardtii*), que le sulfate était réduit en thiosulfate via le PAPS ainsi que l'absence totale de production de sulfite et de sulfure. D'ailleurs, les travaux précédents de Hodson *et al.* (1968) démontraient que le thiosulfate pouvait être assimilé par *C. pyrenoidosa* tout aussi efficacement que le sulfate. Plus récemment, Prieto *et al.* (1997) ont identifié chez *C. reinhardtii* une enzyme permettant la réduction du thiosulfate par les deux réactions suivantes :



Tous les cas recensés indiquent que l'entrée du sulfate se fait contre un gradient de concentration, ce qui est caractéristique d'un système de transport actif. Tous les auteurs arrivent à la conclusion que le contrôle de l'entrée des sulfates se fait par rétro-inhibition. Plusieurs hypothèses ont été émises sur le composé effecteur (cystéine, méthionine, composé soufré non réduit). Si le composé responsable du « feed-back » n'a pas été clairement identifié, certains suggèrent qu'il puisse s'agir de l'APS (Vallée et Jeanjean, 1968b).

Lorsque carencées en S, les algues cessent de se diviser, augmentent en volume et accumulent de l'amidon (Gimmler et Weiss, 1987; Yildiz *et al.*, 1994). On a également

rapporté, dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*, la production d'une enzyme, l'arylsulfatase (Ars; Yildiz *et al.*, 1994). Cette enzyme, localisée dans le périplasme, est à l'affût de composés soufrés et peut même aller chercher le S aromatique. Toutefois, l'apparition d'un système de transport de haute affinité pour le sulfate précède celle de l'Ars, ce qui suggère que le transport stimulé par la carence ne dépend pas de l'Ars (Yildiz *et al.*, 1994). D'ailleurs, d'autres travaux réalisés sur une souche mutante de *C. reinhardtii* ne produisant pas d'Ars ont démontré la même stimulation de transport du sulfate suite à une période de carence (Davies *et al.*, 1994).

11.3 Effet de la lumière

La lumière semble jouer un rôle important dans la cinétique de prise en charge des sulfates. En effet, une pré-incubation dans l'obscurité suivie d'une mesure d'absorption également dans l'obscurité ont révélé des taux de prise en charge quatre et sept fois plus faibles qu'en présence de lumière pour, respectivement, *Chlorella vulgaris* (Vallée et Jeanjean, 1968a) et *Hydrodictyon reticulatum* (Rybová *et al.*, 1988). Une légère diminution de prise en charge dans l'obscurité a été observée pour *Chlamydomonas reinhardtii* (Yildiz *et al.*, 1994); toutefois, les auteurs ne mentionnent pas si les cellules ont été pré-incubées dans l'obscurité. En effet, un passage direct de l'obscurité vers la lumière (ou l'inverse) sans une période d'attente produit des profils d'accumulation intermédiaires (Vallée et Jeanjean, 1968a; Rybová *et al.*, 1988). D'ailleurs, les résultats de Yildiz *et al.* (1994) sont en complète contradiction avec ceux de Pérez-Castiñeira *et al.* (1998), qui mentionnent une « dépendance absolue » de la lumière pour le transport du sulfate chez *Chlamydomonas reinhardtii*. L'influence de la lumière sur la prise en charge des sulfates indique qu'il s'agit là d'un processus qui requiert de l'énergie, ce qui est confirmé par les expériences réalisées à l'aide d'inhibiteurs physiologiques.

Il y a toutefois une exception. La prise en charge du sulfate par *Chlorella ellipsoidea* est de deux fois supérieure dans l'obscurité qu'en présence de lumière, et ce autant pour les cellules carencées que repletées (Matsuda et Colman 1995).

11.4 Effet du pH

Chez *Chlorella ellipsoidea*, la prise en charge de sulfates était 2,5 fois plus élevée à pH 5,5 qu'à pH 7,5 (Matsuda et Colman, 1995). L'inverse a été démontré chez *Chlorella fusca*, pour qui les taux de prise en charge doublent en passant de pH 5,0 à 7,5 pour ensuite tripler jusqu'à pH 8,5-9,0 et finalement diminuer au-delà d'un pH de 9,0. Par contre, aucun effet de pH n'a été décelé chez les cellules carencées en S (Biedlingmaier et Schmidt, 1989). Si un système de co-transport proton / sulfate peut être envisagé pour *C. ellipsoidea*, cela ne semble pas être le cas pour *C. fusca*.

11.5 Inhibiteurs

Il est possible de regrouper les différents inhibiteurs de transport du sulfate selon leurs modes d'action biochimique : i) les inhibiteurs de synthèse de protéines; ii) les analogues du sulfate; et iii) les inhibiteurs métaboliques. Mottley et Griffiths (1977) ont déterminé les concentrations minimales nécessaires pour obtenir un effet inhibiteur chez *Chlamydomonas reinhardtii* pour une multitude de composés. Les sections suivantes visent à récapituler l'efficacité de ces inhibiteurs ainsi que leur utilité dans l'identification des mécanismes de transport des sulfates.

11.5.1 Inhibiteurs de synthèse de protéines

Afin de déterminer si l'inhibition de synthèse de protéines peut bloquer l'apparition d'un système de transport de plus grande affinité lors d'une carence en S, Yildiz *et al.* (1994) ont utilisé deux inhibiteurs de synthèse de protéines : le cycloheximide et le chloramphenicol. Ces inhibiteurs agissent respectivement au niveau du cytosol et du chloroplaste. Les résultats n'indiquaient aucun effet de la part du chloramphenicol (200 mg•L⁻¹) alors que, à l'opposé, l'inhibition était pratiquement totale par le cycloheximide (1 mg•L⁻¹), ce qui suggère que la synthèse de protéines cytoplasmiques est nécessaire pour la stimulation de prise en charge du sulfate chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Yildiz *et al.*, 1994). Cette observation a été confirmée par Matsuda et Colman (1995) chez *Chlorella ellipsoidea* avec du cycloheximide (20 mg•L⁻¹). Ces protéines pourraient servir à la fabrication d'un tout nouveau système de transport, mais il est également possible

que le système existant soit simplement modifié à l'aide de ces protéines. C'est cette dernière hypothèse qui a été retenue par Matsuda et Colman (1995), qui toutefois ne justifient pas clairement leur choix. Force est de reconnaître, toutefois, qu'une prise en charge de type monophasique du sulfate par des cellules carencées de *Chlorella ellipsoidea* laisse présager qu'il n'y a qu'un seul système de transport, ce qui suggère une transformation du système de faible affinité en un système de haute affinité, ou encore l'amélioration d'un système de haute affinité déjà existant mais moins prédominant.

11.5.2 Analogues du sulfate

L'efficacité d'anions possédant une structure moléculaire similaire à celle du sulfate (de type XO_4^{2-} ; éléments du groupe VI A et B du tableau périodique) semble varier selon l'espèce étudiée et les concentrations utilisées. Ces analogues du sulfate sont : le chromate, le thiosulfate, le sulfite, le molybdate, le sélénate et le tungstate. Le tableau D.2 indique l'ordre décroissant d'efficacité des analogues du sulfate à inhiber la prise en charge des sulfates (Vallée et Jeanjean, 1968a; Biedlingmaier et Schmidt, 1989; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998).

L'ordre suggère une sélection du transporteur basée sur la taille de la molécule (poids moléculaire : $CrO_4^{2-} < SeO_4^{2-} < MoO_4^{2-} < WO_4^{2-}$). Dans tous les cas, le chromate s'est avéré être l'analogue le plus efficace, avec une diminution de la prise en charge d'au moins 90 % lorsque sa concentration est dix fois celle des sulfates. Il s'agirait d'une inhibition compétitive (Vallée et Jeanjean, 1968a). Le sélénate et le thiosulfate sont également d'excellents inhibiteurs, du moins pour *Chlorella* et *Chlamydomonas* (seule *M. braunii* est demeurée peu sensible à la présence de thiosulfate). Les effets de ces derniers sur la prise en charge du sulfate chez *C. reinhardtii* ont été étudiés plus en détail par Pérez-Castiñeira *et al.* (1998), en fonction de chacun des deux systèmes de transport. Ils ont relevé que le thiosulfate inhibait de façon compétitive le transport du sulfate par le transporteur de haute affinité ($K_m = 1 \mu M$; $K_I = 40 \mu M$), mais que cette inhibition était de nature non-compétitive pour le transporteur de plus faible affinité ($K_m = 50 \mu M$; $K_I = 75 \mu M$). Ceci expliquerait leur observation selon laquelle les cellules de *C. reinhardtii* cultivées avec du thiosulfate comme seule source de S ont un comportement de cellules

carencées en S lorsque transférées dans un milieu contenant des sulfates. Dans le cas du sélénate, la compétition semble se faire principalement au niveau du site de faible affinité, alors que la réponse du site de haute affinité est plutôt ambiguë (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998).

Tableau D.2 : Efficacité des analogues du sulfate à inhiber son transport.

| <i>Espèce</i> | Ordre décroissant d'efficacité |
|----------------------------------|--|
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | $\text{CrO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{MoO}_4^{2-} \sim \text{SeO}_4^{2-} \sim \text{SO}_3^{2-} \sim \text{WO}_4^{2-}$ |
| <i>Chlorella fusca</i> | $\text{CrO}_4^{2-} > \text{SeO}_4^{2-} \sim \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{SO}_3^{2-} > \text{MoO}_4^{2-} > \text{WO}_4^{2-}$ |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | $\text{CrO}_4^{2-} > \text{SeO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{SO}_3^{2-} \sim \text{MoO}_4^{2-} \sim \text{WO}_4^{2-}$ |
| <i>Monoraphidium braunii</i> | $\text{CrO}_4^{2-} \sim \text{SO}_3^{2-} > \text{SeO}_4^{2-} > \text{MoO}_4^{2-} \sim \text{WO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ |

Le tungstate et le molybdate n'avaient pratiquement aucun effet sur la prise en charge de sulfates chez *C. fusca* (Biedlingmaier et Schmidt, 1989) alors que chez les autres espèces, l'inhibition était faible mais certes mesurable. Une comparaison des taux d'inhibition pour chaque analogue présent dans un rapport de concentration $\text{XO}_4^{2-} : \text{SO}_4^{2-}$ de 10 : 1 indique une différence de sensibilité entre chaque espèce. Ainsi, l'ordre décroissant de sensibilité aux analogues du sulfate pour inhiber la prise en charge de ce dernier est : *C. pyrenoidosa* >> *C. reinhardtii* ~ *M. braunii* > *C. fusca*. Il faut toutefois mentionner que le temps de contact avec l'inhibiteur avant l'ajout de sulfate (pour la mesure de prise en charge) était rarement précisé, ce qui risque de jouer un rôle déterminant. Aucun effet significatif n'a été observé en présence de concentrations élevées (3 mM) de phosphate, de nitrate et de chlorure, indiquant une bonne sélectivité du transporteur (Biedlingmaier et Schmidt, 1989).

Finalement, l'inverse était également vrai pour les effets d'inhibition. Les études d'accumulation et de toxicité du sélénate et du chromate chez les algues *Selenastrum capricornutum* et *Thalassiosira pseudonana* indiquent des effets antagonistes avec le sulfate (Riedel, 1985; Williams *et al.* 1994).

11.5.3 Inhibiteurs métaboliques

Les inhibiteurs métaboliques sont utilisés afin de bloquer le flux d'énergie ou d'électrons. Ainsi, une inhibition causée par un tel inhibiteur peut indiquer que l'énergie (ex. : ATPase) ou la photosynthèse est nécessaire pour la prise en charge de l'anion. Le tableau D.3 dresse un bilan de la plupart des résultats publiés sur les effets des inhibiteurs métaboliques sur la prise en charge du sulfate.

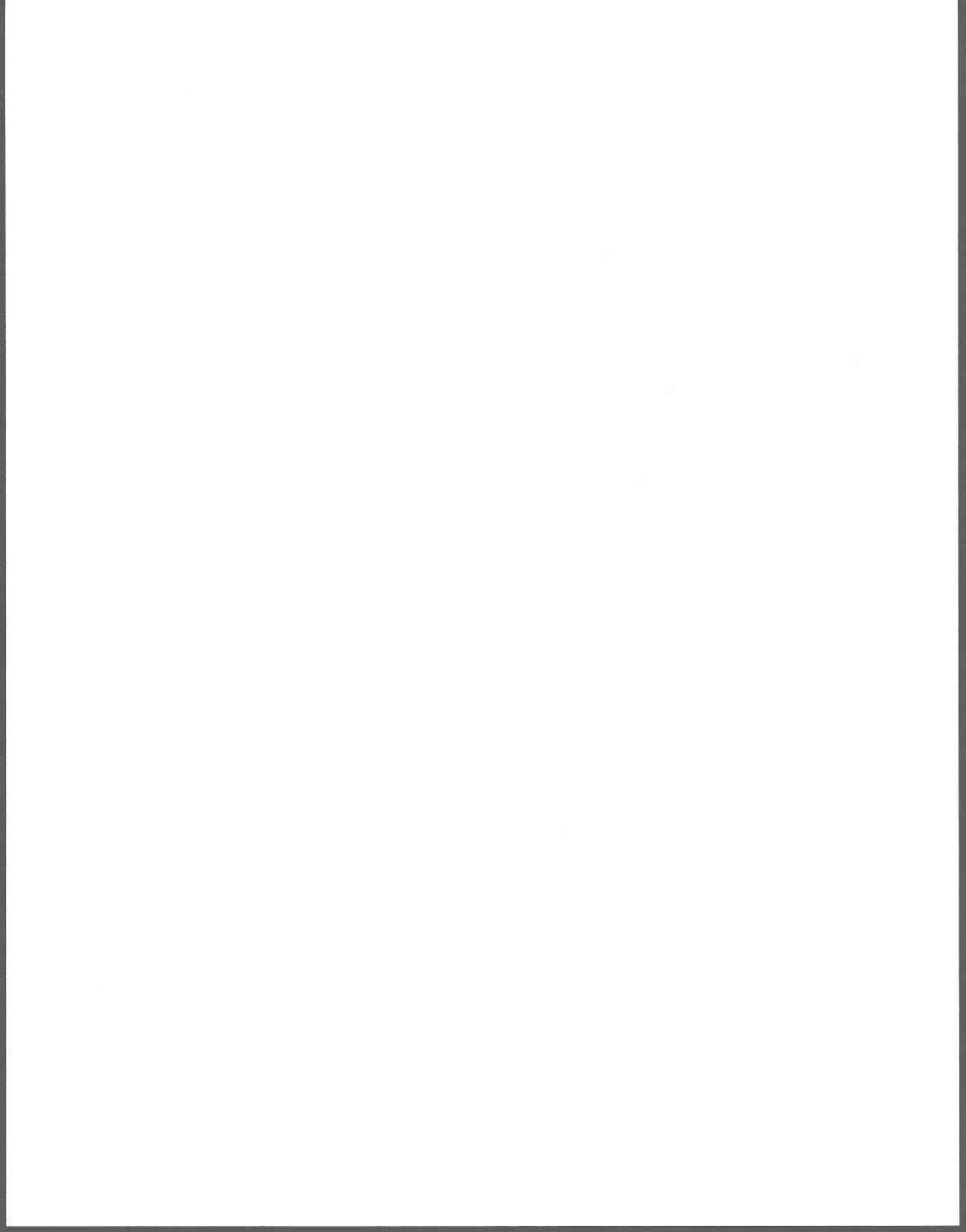
Tableau D.3 : Tableau récapitulatif des effets des inhibiteurs métaboliques sur la prise en charge du sulfate en présence de lumière, exprimés en % de $[^{35}\text{SO}_4]_{\text{cell}}$ par rapport au contrôle (100 %). Le chiffre entre parenthèses indique la concentration d'inhibiteur utilisée.

| Inhibiteur ^a | <i>C. reinhardtii</i> ^b | <i>C. fusca</i> ^c | <i>C. ellipsoidea</i> ^d | <i>H. reticulatum</i> ^e |
|---|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| CN (mM) | - | 62 (1) | 4 (0,8) | 63 (0,4) |
| CCCP (μM) | 0 (30) | 20/0 (10/100) | 0 (30) | 77 (0,5) |
| DCMU (μM) | 84 (20) | 45 (1000) | 112 (20) | 104 (0,5) |
| Vanadate (μM) | 1 (50) | - | 57/39 (50/500) | - |
| TTF+ (μM) | - | - | - | 17 (50) |
| DNP (μM) | - | 39 (1000) | - | 5 (10) |
| DIDS (μM) | - | - | - | 33/10 (100/500) |
| SITS (μM) | - | - | - | 104 (500) |
| Nigéricine ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 7 (15) | - | - | - |
| Valinomycine (μM) | 46 (100) | - | - | - |
| Gramicidine ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0 (100) | - | - | - |
| DMBIB (mM) | - | 84/0 (0,1/1) | - | - |
| DCCD (mM) | 0 (0,25) | 72/27/13 (0,01/0,1/1) | - | - |

a DCCD = N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, CCCP = carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone, DCMU = 3-(3,4-dichlorophenyl)1,1-dimethylurea, DMBIB = 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinon, DNP = 2,4-dinitrophenol, TTF+ = tetrathiafulvalene cation radical, DIDS = 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid, SITS = 4-acetamido-4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid ; b Yildiz *et al.* (1994) ; c Biedlingmaier et Schmidt (1989) ; d Matsuda et Colman (1995) ; e Rybová *et al.* (1988) et Nešpůrková *et al.* (1993)

Parmi les inhibiteurs les plus efficaces, on retrouve l'inhibiteur d'ATPase, DCCD, qui permet d'inhiber l'absorption des sulfates partiellement chez *Chlorella fusca* selon la

concentration utilisée (inhibition de 28 à 87 % entre 10 μM et 1 mM; Biedlingmaier et Schmidt, 1989) et de l'inhiber complètement chez *Chlamydomonas reinhardtii* (100 % d'inhibition à 250 μM ; Yildiz *et al.*, 1994). Également très efficace, le découpleur de phosphorylation, le CCCP, permet d'inhiber complètement l'absorption des sulfates chez *Chlorella fusca* ([CCCP] = 100 μM ; Biedlingmaier et Schmidt, 1989), chez *Chlamydomonas reinhardtii* ([CCCP] = 30 μM ; Yildiz *et al.* 1994) ainsi que chez *Chlorella ellipsoidea* ([CCCP] = 30 μM ; Matsuda et Colman, 1995). Ces résultats indiquent que le transport d'électrons est essentiel comme source d'énergie pour le transport du sulfate. À l'opposé, on peut noter un effet minime ou nul du DCMU, un inhibiteur du photosystème II, à moins d'utiliser d'énormes concentrations (1 mM; Biedlingmaier et Schmidt, 1989), laissant croire que la photophosphorylation ne supporte pas le transport du sulfate (Matsuda et Colman, 1995).



12. ANNEXE E : Calculs de transport diffusif

Des calculs théoriques sur la diffusion des ions en fonction de l'épaisseur de la couche diffuse peuvent fournir des renseignements sur l'importance de certains paramètres tel que la vitesse et la taille de la cellule sur ce processus. Les caractéristiques hydrodynamiques détermineront l'épaisseur de cette couche diffuse à travers laquelle les ions doivent progresser pour atteindre la membrane plasmique. Ces processus ont été particulièrement étudiés en chimie analytique où l'épaisseur de la couche diffuse près de la surface analytique (ex. : goutte de mercure) est critique.

12.1 Effet de la vitesse de l'algue sur l'épaisseur de la couche diffuse

Puisque l'algue cible possède des flagelles, on peut présumer qu'elle se déplace constamment. Ainsi, cette motilité peut contribuer à diminuer l'épaisseur de la couche diffuse ainsi que le mouvement des flagelles à l'intérieur de son environnement immédiat. Il est difficile voire impossible de déterminer avec exactitude la vitesse d'une algue par rapport à son milieu ambiant. Toutefois, Whitfield et Turner (1979) ont estimé que la vitesse maximale d'une algue à 10 fois sa longueur (i.e. 20 fois son rayon). À l'aide de l'équation de Levich (équation 12.1), il est possible d'estimer l'épaisseur de cette couche diffuse (δ_{AV} ; cm) en fonction de la vitesse (v ; $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) de l'algue d'un rayon r (2×10^{-4} cm) par rapport à son milieu :

$$\delta_{AV} = 0,034 \cdot \left(\frac{v}{r^2} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (12.1)$$

Bien que l'épaisseur de la couche diffuse diminue rapidement avec la vitesse de l'algue, cette pente s'adoucit grandement au-delà d'une vitesse de 20 fois son rayon (figure E.1). À l'intérieur de cette gamme $0 - 20 \text{ s}^{-1}$, il y a donc une différence d'environ deux fois dans l'épaisseur de la couche diffuse, passant d'environ $1,6 \times 10^{-3}$ à $0,7 \times 10^{-3}$ cm. Il y a donc lieu de croire que la diffusion augmentera de façon significative à mesure que l'épaisseur diminue.

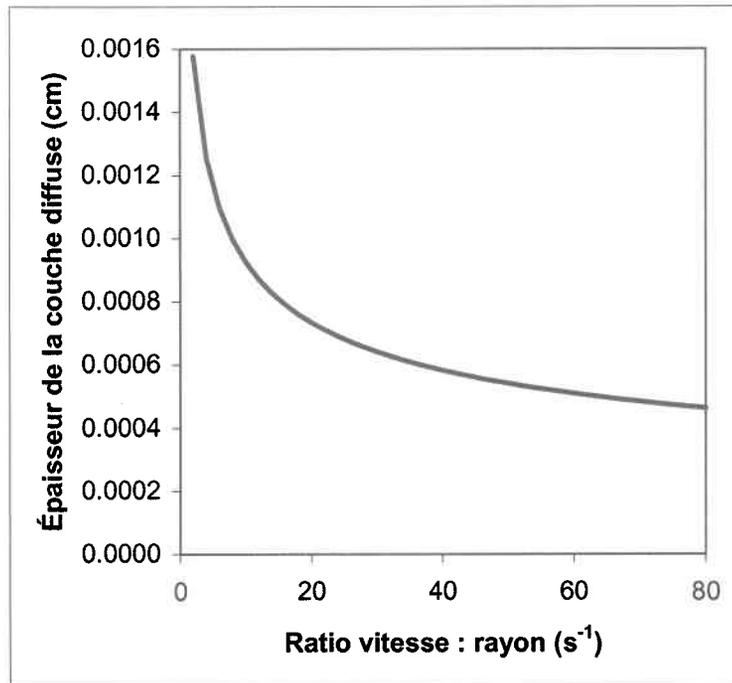


Figure E.1 : Épaisseur de la couche diffuse (δ) en fonction du rapport vitesse : rayon (s^{-1}) selon l'équation de Levich.

12.2 Effet de l'épaisseur de la couche diffuse sur le taux de diffusion

La diffusion d'un ion est décrite par l'équation (4.1). À l'aide de cette équation, il est possible de calculer la diffusion de l'ion Ag^+ en fonction de l'épaisseur de la couche diffuse (figure E.2). Ainsi, le flux de l' Ag^+ ne varie que très légèrement lorsque $\delta > 7 \times 10^{-4}$ cm. Ce n'est que sous cette valeur que le flux augmente de façon marquée. Toutefois, pour atteindre une épaisseur de couche limite inférieure à 7×10^{-4} cm, l'algue doit atteindre des vitesses très élevées par rapport à l'eau dans laquelle elle baigne, soit plus de 20 fois son rayon, la limite maximale estimée par Whitfield et Turner (1979).

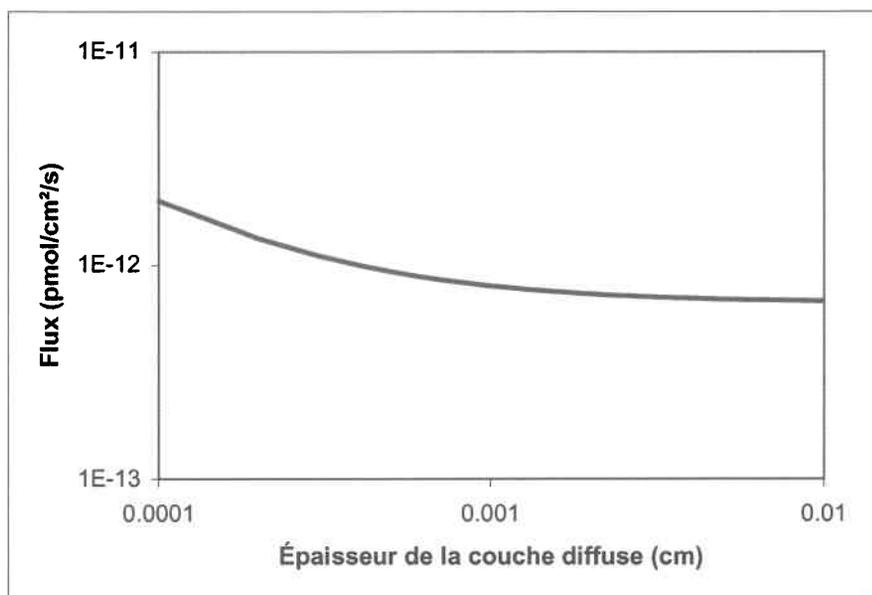
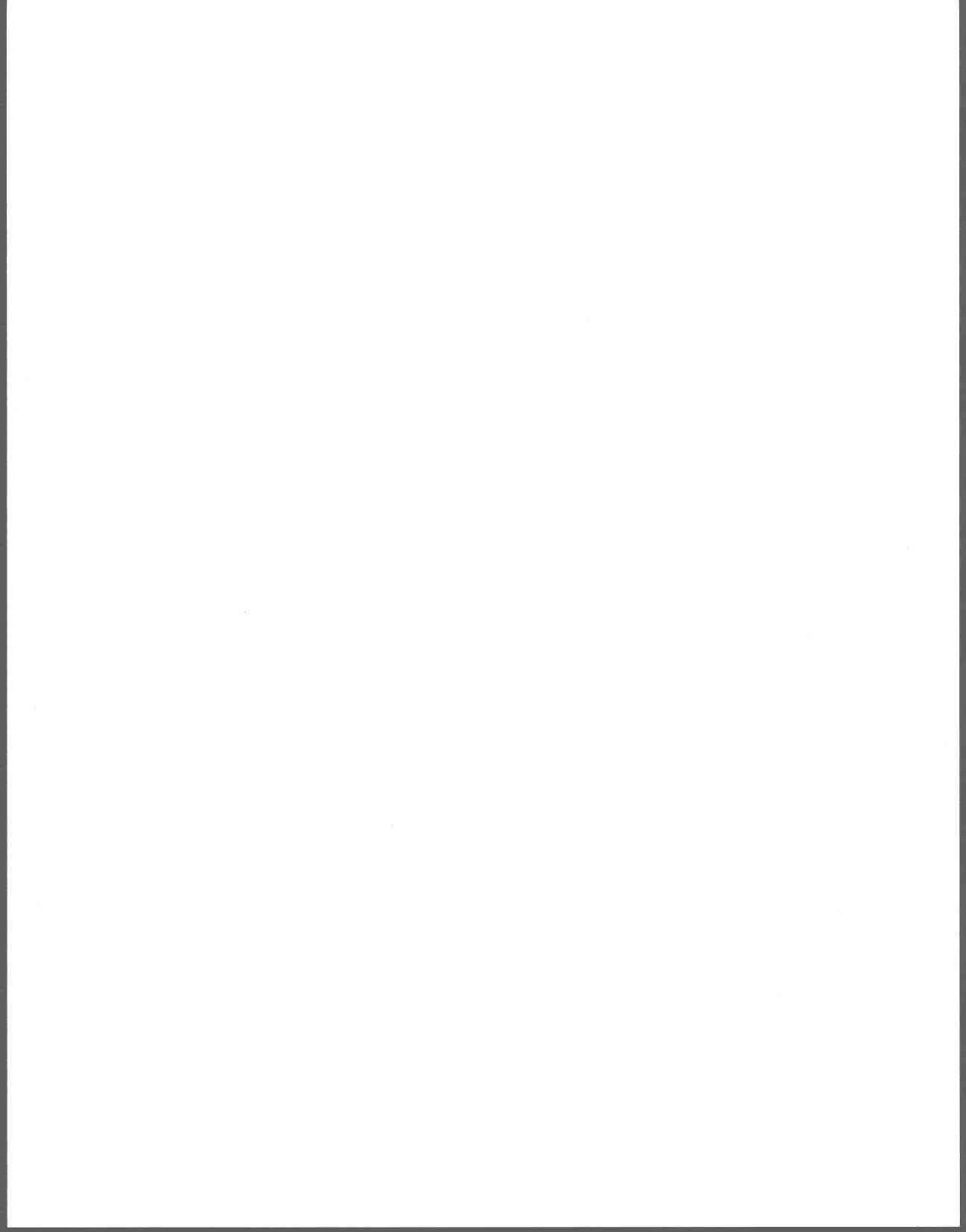


Figure E.2 : Flux à travers la couche limite en fonction de l'épaisseur de la couche diffuse selon l'équation (4.1) pour une concentration externe de 8 nM (C_b) et nulle à la surface (C_s).

Le peu de différence illustré dans le flux d' Ag^+ pour une épaisseur de couche variant dans la gamme de vitesse variant de 0 à 20 fois le rayon de l'algue expliquerait pourquoi l'agitation des flacons d'expositions n'a pas eu d'effet sur la prise en charge de l'argent (figure 3.3). Les algues étant agitées en même temps que le milieu, il y a lieu de croire que l'épaisseur de la couche diffuse n'a pas été suffisamment réduite pour augmenter le flux d' Ag^+ vers la membrane plasmique.



13. BIBLIOGRAPHIE

1. Adams, N. W. H. et J. R. Kramer. (1998). Reactivity of Ag^+ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide. Environ. Toxicol. Chem., 17, 594-600.
2. Adams, N. W. H. et J. R. Kramer. (1999a). Silver speciation in wastewater effluent, surface waters, and pore waters. Environ. Toxicol. Chem., 18, 2667-2673.
3. Adams, N. W. H. et J. R. Kramer. (1999b). Determination of silver speciation in wastewater and receiving waters by competitive ligand equilibration/solvent extraction. Environ. Toxicol. Chem., 18, 2674-2680.
4. Aparicio, P. J., F. G. Witt, J. M. Ramírez, M. A. Quiñones et T. Baladín. (1994). Blue-light-induced pH changes associated with NO_3^- , NO_2^- and Cl^- uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. Plant, Cell Environ., 17, 1323-1330.
5. Ballan-Dufrançais, C., C. Marcaillou et C. Amiard-Triquet. (1991). Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. Biol. Cell, 72, 103-112.
6. Bates, S. S., M. Létourneau, A. Tessier et P. G. C. Campbell. (1983). Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40, 895-904.
7. Bates, S. S., A. Tessier, P. G. C. Campbell et J. Buffle. (1982). Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. J. Phycol., 18, 521-529.
8. Bennett, W. N. (1988). Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. Wat. Res., 22, 939-942.
9. Bennett, W. N. (1990). Measurement of manganese amelioration of cadmium toxicity in *Chlorella pyrenoidosa* using turbidostat culture. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19, 118-123.
10. Bennett, W. N. et A. S. Brooks. (1989). Measurement of zinc amelioration of cadmium toxicity in *Chlorella pyrenoidosa* using turbidostat culture. Environ. Toxicol. Chem., 8, 877-882.
11. Benoit, G. (1994). Clean technique measurement of Pb, Ag, and Cd in freshwater: A redefinition of metal pollution. Environ. Sci. Technol., 28, 1987-1991.

12. Betti, M. et P. Papoff. (1988). Trace elements: Data and information in the characterization of an aqueous ecosystem. Crit. Rev. Anal. Chem., 19: 271-322.
13. Biedlingmaier, S. et A. Schmidt. (1989). Sulfate transport in normal and S-deprived *Chlorella fusca*. Z. Naturforsch., 44c, 495-503.
14. Block, M. et A. Wicklund Glynn (1992). Influence of xanthates on the uptake of ¹⁰⁹Cd by eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 11, 873-879.
15. Bornancin, M., G. De Renzis et R. Naon. (1980). Cl⁻-HCO₃⁻-ATPase in gills of the rainbow trout: evidence for its microsomal localization. Am. J. Physiol., 238, R251-R259.
16. Bringmann, G. et R. Kühn. (1980). Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test. Wat. Res., 14, 231-241.
17. Buffle, J., et W. Stumm. (1994). General chemistry of aquatic systems. Dans J. Buffle et R. R. DeVitre (Eds), *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. Boca Raton, FL, USA: Lewis. p. 1-42.
18. Bury, N. R., F. Galvez et C. M. Wood. (1999b). Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: Comparison between rainbow trout and fathead minnows. Environ. Toxicol. Chem., 18, 56-62.
19. Bury, N. R., J. C. McGeer et C. M. Wood. (1999a). Effects of altering freshwater chemistry on physiological responses of rainbow trout to silver exposure. Environ. Toxicol. Chem., 18, 49-55.
20. Cain, J. R. et R. K. Allen. (1980). Use of a cell wall-less mutant strain to assess the role of the cell wall in cadmium and mercury tolerance by *Chlamydomonas reinhardtii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25, 797-801.
21. Campbell, P. G. C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. Dans A. Tessier et D. R. Turner (Eds), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. p. 45-102.
22. Canterford, G. S. et D. R. Canterford. (1980). Toxicity of heavy metals to the marine diatom *Ditylum brightwellii* (West) Grunow: Correlation between toxicity and metal speciation. J. Mar. Biol. Ass., 60, 227-242.
23. Ciglonecki, I. et B. Cosovic. (1997). Electrochemical determination of thiosulfate in seawater in the presence of elemental sulfur and sulfide. Electroanalysis, 9, 775-780.

24. Clarkson, T. W. (1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32, 545-571.
25. Connell, D. B., J. G. Sanders, G. F. Riedel et G. R. Abbe. (1991). Pathways of silver uptake and trophic transfer in estuarine organisms. Environ. Sci. Technol., 25, 921-924.
26. Cooper, C. F. et W. C. Jolly. (1970). Ecological effects of silver iodide and other weather modification agents: A review. Water Resour. Res., 6, 88-98.
27. Cowan, C. E., E. A. Jenne et E. A. Crecelius. (1985). Silver speciation in seawater: the importance of sulfide and organic complexation. Dans A. C. Sigleo et H. Akihiko *Marine and Estuarine Geochemistry*. Chelsea, Michigan: Lewis Publ. p. 285-303.
28. Craig, S. R. et K. Budd. (1979). Chloride uptake by *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). J. Phycol., 15, 300-304.
29. Crank, J. (1956). The mathematics of diffusion. Oxford, UK: The Clarendon Press. 347 p.
30. Davies, D. R. et A. Plaskitt. (1971). Genetical and structural analyses of cell-wall formation in *Chlamydomonas reinhardi*. Genet. Res., 17, 33-43.
31. Davies, J. P., F. Yildiz et A. R. Grossman. (1994). Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. Plant Cell, 6, 53-63.
32. DiToro, D. M., H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, R. C. Santore, et P. R. Paquin. (2000). The biotic ligand model: A computational approach for assessing the ecological effect of metals in aquatic systems. New York, NY, USA: International Copper Association.
33. Dreyfuss, J. (1964). Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem., 239, 2292-2297.
34. Druschel, G. K., R. J. Hamers et J. F. Banfield. (1999). Rates and products of thiosulfate and polythionate oxidation by Fe³⁺ and O₂: Implications for sulfide oxidation, microbial energy utilization, and mass balance in acid mine drainage environments. GSA Annual Meeting, Abstract 52270, Denver, CO.
35. Duan, C. et T. Hirano. (1992). Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the in-vitro uptake of sulphate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors. J. Endocrinol., 133, 211-219.

36. Duan, C. et Y. Inui. (1990). Effects of recombinant eel growth hormone on the uptake of [³⁵S]sulfate by ceratobranchial cartilages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Gen. Comp. Endocrinol., 79, 320-325.
37. Duan, C., T. Noso, S. Moriyama, H. Kawauchi et T. Hirano. (1992). Eel insulin: isolation, characterization and stimulatory actions on [³⁵S]sulphate and [³H]thymidine uptake in the branchial cartilage of the eel *in vitro*. J. Endocrinol., 133, 221-230.
38. Dufficy, T. J., R. Cappel et S. M. Summers. (1993). Silver discharge regulations questioned. Wat. Environ. Technol., 5, 52-56.
39. Eckhardt, U. et T. J. Buckhout. (1998). Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants. J. Exp. Bot., 49, 1219-1226.
40. Eisler, R. (1996). Silver hazards to fish, wildlife, and invertebrates : A synoptic review. Biological Science Report no 32. Washington, D.C., USA : U.S. Department of the Interior, National Biological Service. 44 p.
41. Engel, D. W., W. G. Sunda et B. A. Fowler. (1981). Factors affecting trace metal uptake and toxicity to estuarine organisms. I. Environmental parameters. Dans F. J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg et W. B. Vernberg (Eds), *Biological Monitoring of Marine Pollutants*. New York, NY, USA: Academic Press. p. 127-144.
42. Erickson, R. J., L. T. Brooke, M. D. Kahl, F. V. Venter, S. L. Harting, T. P. Markee et R. L. Spehar. (1998). Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. Environ. Toxicol. Chem., 17, 572-578.
43. Errécalde, O. et P. G. C. Campbell. (2000). Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. J. Phycol., 36, 473-483.
44. Errécalde, O., M. Seidl et P. G. C. Campbell. (1998). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model. Wat. Res., 32, 419-429.
45. Ferguson, E. A. et C. Hogstrand. (1998). Acute silver toxicity to seawater-acclimated rainbow trout: Influence of salinity on toxicity and silver speciation. Environ. Toxicol. Chem., 17, 589-593.
46. Fisher, N. S. (1985). Accumulation of metals by marine picoplankton. Mar. Biol., 87, 137-142.

47. Fisher, N. S., M. Bohé et J.-L. Teyssié. (1984). Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in four marine phytoplankters. Mar. Ecol. Prog. Ser., 18, 201-203.
48. Fisher, N. S., V. T. Breslin et M. Levandowsky. (1995). Accumulation of silver and lead in estuarine microzooplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser., 116, 207-215.
49. Fortin, C. et J. Gauthier. (1995). Constantes de formation et différences d'enthalpie pour divers complexes métalliques: comparaison de différentes bases de données. Rapport No RI-136. QC, Canada : INRS-Eau, Université du Québec. 13 p.
50. Galloway, G. N., J. D. Thornton, S. A. Norton, H. L. Volchok et R. A. N. McLean. (1982). Trace metals in atmospheric deposition: A review and assessment. Atmos. Environ., 16, 1677-1700.
51. Galvez, F. et C. M. Wood. (1997). The relative importance of water hardness and chloride levels in modifying the acute toxicity of silver to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 16, 2363-2368.
52. Garnier, J. et J. P. Baudin. (1989). Accumulation and depuration of silver-110m by a planktonic alga, *Scenedesmus obliquus*. Water, Air, Soil Pollut., 45, 287-299.
53. Ghandour, W., J. A. Hubbard, J. Deistung, M. N. Hughes et R. K. Poole. (1988). The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: Toxic effects and interaction with copper ions. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 559-565.
54. Gimmler, H. et C. Weiss. (1987). The effect of sulfate deficiency and excess sulfate on growth and metabolism of *Dunaliella parva*. J. Plant Physiol., 131, 449-465.
55. Gingras, S. (1997). La station d'épuration des eaux de la CUM - les toxiques entrent et les toxiques sortent. L'enjeu. 17, 23-24.
56. Granger, J. et N. M. Price. (1999). The importance of siderophores in iron nutrition of heterotrophic marine bacteria. Limnol. Oceanogr., 44, 541-555.
57. Grosell, M., C. Hogstrand, C. M. Wood et H. J. M. Hansen. (2000). A nose-to-nose comparison of the physiological effects of exposure to ionic silver versus silver chloride in the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol., 48, 327-342.
58. Gutknecht, J. (1981). Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. J. Membrane Biol., 61, 61-66.

59. Harris, E. H. (1989). The *Chlamydomonas* Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Toronto: Academic Press. 780 p.
60. Harrison, G. I., P. G. C. Campbell et A. Tessier. (1986). Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43, 687-693.
61. Havelaar, A. C., I. L. de Gast, S. Snijders, C. E. M. T. Beerens, G. M. S. Mancini et F. W. Verhijen. (1998). Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane. FEBS Lett., 436, 223-227.
62. Hedrich, R. (1994). Voltage-dependent chloride channels in plant cells: Identification, characterization, and regulation of a guard cell anion channel. Dans W. B. Guggino (Ed). *Current Topics in Membranes*. Vol. 42. San Diego: Academic Press. p. 1-33.
63. Hill, K. L., R. Hassett, D. Kosman et S. Merchant. (1996). Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. Plant Physiol., 112, 697-704.
64. Hirsch, R., J. Carandang, B. Treffny et H. Gimmler. (1992). Cl⁻ fluxes and Cl⁻ content of *Dunaliella acidophila* - An alga with a positive membrane potential. J. Exp. Bot., 43, 887-896.
65. Hodson, R. C. et J. A. Schiff. (1971). Studies of sulfate utilization by algae. 8. The ubiquity of sulfate reduction to thiosulfate. Plant Physiol., 47, 296-299.
66. Hodson, R. C., J. A. Schiff et A. J. Scarsella. (1968). Studies of sulfate utilization by algae. 7. *In vivo* metabolism of thiosulfate by *Chlorella*. Plant Physiol., 43, 570-577.
67. Hogstrand, C., F. Galvez et C. M. Wood. (1996). Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. Environ. Toxicol. Chem., 15, 1102-1108.
68. Hogstrand, C. et C. M. Wood. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. Environ. Toxicol. Chem., 17, 547-561.
69. Howe, G. et S. Merchant. (1992). Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol., 98, 127-136.
70. Hudson, R. J. M. (1998). Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. Sci. Total Environ., 219, 95-115.

71. Hudson, R. J. M. et F. M. M. Morel. (1990). Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions. Limnol. Oceanogr., 35, 1002-1020.
72. Hyams, J. et D. R. Davies. (1972). The induction and characterisation of cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. Mutation Res., 14, 381-389.
73. Jackson, G. A. et J. J. Morgan. (1978). Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: Theoretical analysis and comparison with reported observations. Limnol. Oceanogr., 23, 268-282.
74. Janes, N. et R. C. Playle. (1995). Modeling silver binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 14, 1847-1858.
75. Kalfakakou, V. et T. J. B. Simons. (1990). Anionic mechanisms of zinc uptake across the human red cell membrane. J. Physiol., 421, 485-497.
76. Karen, D. J., D. R. Ownby, B. L. Forsythe, T. P. Bills, T. W. LaPoint, G. B. Cobb et S. J. Klaine. (1999). Influence of water quality on silver toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fathead minnows (*Pimephales promelas*), and water fleas (*Daphnia magna*). Environ. Toxicol. Chem., 18, 63-70.
77. Kariuki, S. et H. D. Dewald. (1996). Evaluation of diffusion coefficients of metallic ions in aqueous solutions. Electroanalysis, 8, 307-313.
78. Knauer, K., R. Behra et L. Sigg. (1997a). Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (*Chlorophyta*). J. Phycol., 33, 596-601.
79. Knauer, K., R. Behra et L. Sigg. (1997b). Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. Environ. Toxicol. Chem., 16, 220-229.
80. Koettters, P. J., H.-F. Chou et A. J. Jonas. (1995). Lysosomal sulfate transport: inhibitor studies. Biochim. Biophys. Acta, 1235, 79-84.
81. Leblanc, G. A., J. D. Mastone, A. P. Paradice, B. F. Wilson, H. B. Lockhart et K. A. Robillard. (1984). The influence of speciation on the toxicity of silver to fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ. Toxicol. Chem., 3, 37-46.
82. Li, Y.-H. et S. Gregory. (1974). Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments. Geochim. Cosmochim. Acta, 38, 703-714.
83. Lou, M., R. Garay et J. O. Alda. (1991). Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells. J. Physiol., 443, 123-136.

84. Luther III, G. W., T. M. Church, A. E. Giblin et R. W. Howarth. (1986). Speciation of dissolved sulfur in salt marshes by polarographic methods. Dans M. L. Sohn (Ed). *Organic marine geochemistry*. Washington, D.C. : ACS Symposium Series 305. p. 340-355.
85. Luther III, G. W., T. M. Church, J. R. Scudlark et M. Cosman. (1986). Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore waters. Science, 232, 746-749.
86. Luther III, G. W., A. E. Giblin et R. Varsolona. (1985). Polarographic analysis of sulfur species in marine porewaters. Limnol. Oceanogr., 30, 727-736.
87. Lytle, E. (1984). Fate and speciation of silver in publicly owned treatment works. Environ. Toxicol. Chem., 3, 21-30.
88. Macfie, S. M., Y. Tarmohamed et P. M. Welbourn. (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27, 454-458.
89. Marchant, T. A. et B. M. Moroz. (1993). Hormonal influences on *in vitro* [³⁵S]-sulfate uptake by gill arches from the goldfish (*Carassius auratus* L.). Fish Physiol. Biochem., 11, 393-399.
90. Martell, A. E., R. M. Smith et R. J. Motekaitis. (1998). NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database (Version 5.0) [NIST Standard Reference Database 46]. Gaithersburg, MD, USA: U.S. Department of Commerce.
91. Martin, J. H., G. A. Knauer et R. M. Gordon. (1983). Silver distributions and fluxes in north-east Pacific waters. Nature, 305, 306-309.
92. Mason, R. P., J. R. Reinfelder et F. M. M. Morel. (1996). Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. Environ. Sci. Technol., 30, 1835-1845.
93. Matsuda, Y. et B. Colman. (1995). Characterization of sulfate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea*. Plant Cell Physiol., 36, 1291-1296.
94. McCormick, S. D., P. I. Tsai, K. M. Kelley, R. S. Nishioka et H. A. Bern. (1992). Hormonal control of sulfate uptake by branchial cartilage of Coho salmon: role of IGF-I. J. Exp. Zool., 262, 166-171.
95. McGeer, J. C. et C. M. Wood. (1998). Protective effects of water Cl⁻ on physiological responses to waterborne silver in rainbow trout. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55, 2447-2454.

96. Meyer, J. S. (1999). A mechanistic explanation for the $\ln(\text{LC50})$ vs $\ln(\text{Hardness})$ adjustment equation for metals. Environ. Sci. Technol., 33, 908-912.
97. Meyer, J. S., R. C. Santore, J. P. Bobbitt, L. D. DeBrey, C. J. Boese, P. R. Paquin, H. E. Allen, H. L. Bergman et D. M. DiToro. (1999). Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not. Environ. Sci. Technol., 33, 913-916.
98. Miller, L. A. et K. W. Bruland. (1995). Organic speciation of silver in marine waters. Environ. Sci. Technol., 29, 2616-2621.
99. Monheimer, R. H. (1981). Effect of light intensity on sulfate uptake and primary productivity by natural freshwater microplankton communities and axenical cultures. Hydrobiologia, 79, 121-127.
100. Morel, F. M. M. (1983). Principles of Aquatic Chemistry. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 446 p.
101. Morel, F. M. M., et J. G. Hering. (1993). Principles and Applications of Aquatic Chemistry. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 588 p.
102. Morgan, I. J., R. P. Henry et C. M. Wood. (1997). The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na^+ and Cl^- transport. Aquat. Toxicol., 38, 145-163.
103. Mottley, J. et D. E. Griffiths. (1977). Minimum inhibitory concentrations of a broad range of inhibitors for the alga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. J. Gen. Microbiol., 102, 431-434.
104. Mukherjee, A. B. (1997). The use and release of silver in Finland. Helsinki, Finland: EDITA. 46 p.
105. Nebeker, A. V. (1982). Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. Wat. Res., 16, 739-744.
106. Nešpůrková, L., J. Lazarová, K. Janáček et R. Rybová. (1993). Effects of electron acceptors on anion uptake in *Hydrodictyon reticulatum*. J. Plant Physiol., 141, 533-537.
107. Nielsen, L. W., L. M. Massey. (1940). Silver as a fungicide. Dans L. Addicks (Ed). *Silver in Industry*. New York, NY, USA: Reinhold Publishing Corp. p. 431-450.
108. Nissen, P. (1974). Uptake mechanisms : Inorganic and organic. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 53-79.

109. O'Kelley, J. C. (1974). Inorganic nutrients. Dans W. D. P. Stewart (Ed). *Algal physiology and biochemistry*. Berkeley, CA, USA: University of California Press. p. 610-635.
110. Odermatt, A., R. Krapf et M. Solioz. (1994). Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. Biochem. Biophys. Res. Commun., 202, 44-48.
111. Pasciak, W. J. et J. Gavis. (1974). Transport limited nutrient uptake rates in *Ditylum brightwellii*. Limnol. Oceanogr., 19, 881-888.
112. Perez-Castiñeira, J. R., J. L. Prieto, J. G. González-Arroyo et J. M. Vega. (1998). Kinetic properties of sulfate uptake in two types of eukaryotic green microalgae. J. Plant Physiol., 153, 324-331.
113. Perez-Castiñeira, J. R., J. L. Prieto et J. M. Vega. (1992). Sulfate uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. Phyton, 32, 91-94.
114. Phinney, J. T. et K. W. Bruland. (1994). Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Environ. Sci. Technol., 28, 1781-1790.
115. Ploug, H., W. Stolte et B. B. Jorgensen. (1999a). Diffusive boundary layers, photosynthesis and respiration of the colony-forming plankton algae, *Phaeocystis* sp. Limnol. Oceanogr., 44, 1949-1958.
116. Ploug, H., W. Stolte et B. B. Jorgensen. (1999b). Diffusive boundary layers of the colony-forming plankton alga *Phaeocystis* sp. - implications for nutrient uptake and cellular growth. Limnol. Oceanogr., 44, 1959-1967.
117. Prasad, M. N. V., K. Drej, A. Skawinska et K. Stralka. (1998). Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60, 306-311.
118. Price, N. M., G. I. Harrison, J. G. Hering, R. J. Hudson, P. M. Nirel, B. Palenik et F. M. M. Morel. (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. Biol. Oceanogr., 6, 443-461.
119. Prieto, J. L., J. R. Perez-Castiñeira et J. M. Vega. (1997). Thiosulfate reductase from *Chlamydomonas*. J. Plant. Physiol., 151, 385-389.
120. Purcell, T. W. et J. P. Peters. (1998). Sources of silver in the environment. Environ. Toxicol. Chem., 17, 537-538.
121. Quiñones, M. A., N. Giráldez, F. G. Witt et P. J. Aparicio. (1997). Blue light-dependent monovalent anion uptake. Physiol. Plant., 100, 45-52.

122. Rai, L. C. et M. Raizada. (1985). Effect of nickel and silver ions on survival, growth, carbon fixation and nitrogenase activity in *Nostoc muscorum*: Regulation of toxicity in EDTA and calcium. J. Gen. Appl. Microbiol., 31, 329-338.
123. Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. Environ. Toxicol. Chem., 18, 89-108.
124. Raven, J. A. (1980). Nutrient transport in microalgae. Dans A. H. Rose et J. G. Morris (Eds), *Microbial physiology*. Vol. 21. New York, NY, USA: Academic Press. p. 47-226.
125. Raven, J. A. (1976). Transport in algal cells. Dans A. Pirson et M. H. Zimmermann (Eds), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 2A. New York, NY, USA: Springer-Verlag. p. 129-188.
126. Reinfelder, J. R. et S. I. Chang. (1999). Speciation and microalgal bioavailability of inorganic silver. Environ. Sci. Technol., 33, 1860-1863.
127. Riedel, G. F. (1985). The relationship between chromium(VI) uptake, sulfate uptake, and chromium(VI) toxicity in the estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*. Aquat. Toxicol., 7, 191-204.
128. Rodgers, J. H., E. Deaver, B. C. Suedel et P. L. Rogers. (1997). Comparative aqueous toxicity of silver compounds: Laboratory studies with freshwater species. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58, 851-858.
129. Rosenthal, H. L. (1961). The uptake and turnover of S³⁵ sulfate by *Lebistes*. Biol. Bull., 120, 183-191.
130. Rozan, T. F. et G. Benoit. (1999). Geochemical factors controlling free Cu ion concentrations in river water. Geochim. Cosmochim. Acta, 63, 3311-3319.
131. Rozan, T. F., G. Benoit, H. Marsh et Y.-P. Chin. (1999). Intercomparison of DPASV and ISE for the measurement of Cu complexation characteristics of NOM in freshwater. Environ. Sci. Technol., 33, 1766-1770.
132. Rozan, T. F., M. E. Lassman, D. P. Ridge et G.W. Luther III. (2000). Evidence for iron, copper and zinc complexation as multinuclear sulphide clusters in oxic rivers. Nature. (sous presse).
133. Rybová, R., L. Nešpůrková et K. Janáček. (1988). Sulphate ion influx and efflux in *Hydrodictyon reticulatum*. Biol. Plant., 30, 440-450.
134. Sanders, D. (1984). Gradient coupled chloride transport in plant cells. Dans G. A. Gerencser (Ed.), *Chloride Transport Coupling in Biological Membranes and Epithelia*. New York, NY, USA: Elsevier. p. 63-120.

135. Sanders, J. G. et S. J. Cibik. (1988). Response of Chesapeake Bay phytoplankton communities to low levels of toxic substances. Mar. Pollut. Bull., 19, 439-444.
136. Sanford, L. P. et S. M. Crawford. (2000). Mass transfer versus kinetic control of uptake across solid-water boundaries. Limnol. Oceanogr., 45, 1180-1186.
137. Sañudo-Wilhelmy, S. A., I. Rivera-Duarte et A. R. Flegal. (1996). Distribution of colloidal trace metals in the San Francisco Bay estuary. Geochim. Cosmochim. Acta, 60: 4933-4944.
138. Sarin, C., J. M. Hall, J. Cotter-Howells, K. Killham et M. S. Cresser. (2000). Influence of complexation with chloride on the responses of a *lux*-marked bacteria bioassay to cadmium, copper, lead, and mercury. Environ. Toxicol. Chem., 19, 259-264.
139. Schecher, W. D. et D. McAvoy. (1994). MINEQL+: A Chemical Equilibrium Program for Personal Computers (Version 3.01) Hallowell, ME, USA: Environmental Research Software.
140. Schenck, R. C., A. Tessier et P. G. C. Campbell. (1988). The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. Limnol. Oceanogr., 33, 538-550.
141. Shavlovski, M. M., N. A. Chebotar, L. A. Konopistseva, E. T. Zakharova, A. M. Kachourin, V. B. Vassiliev et V. S. Gaitskhoki. (1995). Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin - further evidence for its role in the transport of copper. BioMetals, 8, 122-128.
142. Sirko, A., M. Zatyka, E. Sadowy et D. Hulanicka. (1995). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. J. Bacteriol., 177, 4134-4136.
143. Smolders, E. et M. J. McLaughlin. (1996a). Effect of Cl on Cd uptake by Swiss chard in nutrient solutions. Plant and Soil, 179, 57-64.
144. Smolders, E. et M. J. McLaughlin. (1996b). Chloride increases cadmium uptake in Swiss chard in a resin-buffered nutrient solution. Soil Sci. Soc. Am. J., 60, 1443-1447.
145. Solioz, M. et A. Odermatt. (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem., 270, 9217-9221.
146. Spieß, I., J. Wang, R. Benz et U. Zimmermann. (1993). Characterization of the chloride carrier in the plasmalemma of the alga *Valonia utricularis* : The inhibition by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2-2'-disulfonic acid. Biochim. Biophys. Acta, 1149, 93-101.

147. Stahlmann, J., R. Warthmann et H. Cypionka. (1991). Na⁺-dependent accumulation of sulfate and thiosulfate in marine sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol., 155, 554-558.
148. Stary, J., K. Kratzer et J. Prasilova. (1983). Systematic study of the cumulation of elements on algae. Toxicol. Environ. Chem., 7, 47-61.
149. Stein, W. D. (1990). Channels, Carriers, and Pumps - An Introduction to Membrane Transport. San Diego, USA: Academic Press. 326 p.
150. Stokes, P. M. (1981). Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae. J. Plant Nutr., 3, 667-678.
151. Sunda, W. G., D. W. Engel et R. M. Thuotte. (1978). Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: Importance of free cadmium ion. Environ. Sci. Technol., 12, 409-413.
152. Tarmohamed, Y. (1990). The role of the cell wall in nickel and cadmium toxicity and uptake in two strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. Thèse de maîtrise. University of Toronto, Toronto. 192 p.
153. Tessier, A., J. Buffle, et P. G. C. Campbell. (1994). Uptake of trace metals by aquatic organisms. Dans J. Buffle et R. R. DeVitre (Eds), *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. Boca Raton, FL, USA: Lewis. p. 197-230.
154. Thaler, M., W. Simonis et G. Schönknecht. (1992). Light-dependent changes of the cytoplasmic H⁺ and Cl⁻ activity in the green alga *Eremosphaera viridis*. Plant Physiol., 99, 103-110.
155. Thamdrup, B., K. Finster, H. Fossing, J. W. Hansen et B. B. Jorgensen. (1994). Thiosulfate and sulfite distributions in porewater of marine sediments related to manganese, iron, and sulfur geochemistry. Geochim. Cosmochim. Acta, 58, 67-73.
156. Turbak, S. C., S. B. Olson et G. A. McFeters. (1986). Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. Wat. Res., 20, 91-96.
157. USEPA. Ambient aquatic life water quality criteria for silver. (1987). Rapport No. 440/5-87-011. Duluth, MN, USA: Office of Research and Development. 104 p.
158. USEPA. (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. (Version 2.0). Duluth, MN, USA: Environmental Research Laboratory.

159. Vallée, M. et R. Jeanjean. (1968a). Le système de transport de SO_4^{2-} chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. I. Étude cinétique de la perméation. Biochim. Biophys. Acta, 150, 599-606.
160. Vallée, M. et R. Jeanjean. (1968b). Le système de transport de SO_4^{2-} chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. II. Recherches sur la régulation de l'entrée. Biochim. Biophys. Acta, 150, 607-617.
161. Valravamurthy, A. et K. Mopper. (1990). Determination of sulfite and thiosulfate in aqueous samples including anoxic seawater by liquid chromatography after derivatization with 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine). Environ. Sci. Technol., 24, 333-337.
162. van Ginneken, L. et R. Blust. (2000). Determination of conditional stability constants of cadmium-humic acid complexes in freshwater by use of a competitive ligand equilibration-solvent extraction technique. Environ. Toxicol. Chem., 19, 283-292.
163. van Leeuwen, H. P. (1999). Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. Environ. Sci. Technol., 33, 3743-3748.
164. Vasconcelos, M. T. S. D., M. A. G. O. Azenha et O. M. Lage. (1996). Electrochemical evidence of surfactant activity of the HEPES pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures *in vitro*. Anal. Biochem., 248-253.
165. Verheijen, F. W., C. E. M. T. Beerens, A. C. Havelaar, W. J. Kleijer et G. M. S. Mancini. (1998). Fibroblast silver loading for the diagnosis of Menkes disease. J. Med. Genet., 35, 849-851.
166. Vigneault, B. (2000). Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires – mécanismes et implications. Thèse de doctorat. INRS-Eau, Université du Québec. Québec. 165 p.
167. Wang, W.-X., N. S. Fisher et S. N. Luoma. (1996). Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 140, 91-113.
168. Webb, N. A. et C. M. Wood. (1998). Physiological analysis of the stress response associated with acute silver nitrate exposure in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 17, 579-588.
169. Weger, H. G. (1999). Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: experiments using iron-limited chemostats. Planta, 207, 377-384.

170. Whitfield, M. et D. R. Turner. (1979). Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. Dans E. A. Jenne (Ed), *Chemical modeling in aqueous systems - Speciation, sorption, solubility and kinetics*. Washington, D.C., USA: ACS Symp. Ser. p. 657-680.
171. Whitlow, S. I. et D. L. Rice. (1985). Silver complexation in river waters of central New York. Wat. Res., 19, 619-626.
172. Wilkinson, K. J., P. G. C. Campbell et P. Couture. (1990). Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47, 1446-1452.
173. Williams, M. J., R. S. Ogle, A. W. Knight et R. G. Burau. (1994). Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenastrum capricornutum*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27, 449-453.
174. Wittmann G. (1981) Toxic metals. Dans U. Förstner et G.T.W. Wittmann (Eds), *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. New York, NY, USA: Springer-Verlag. p. 3-68.
175. Wood, C. M., C. Hogstrand, F. Galvez et R. S. Munger. (1996a). The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺. Aquat. Toxicol., 35, 93-109.
176. Wood, C. M., C. Hogstrand, F. Galvez et R. S. Munger. (1996b). The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 2. The effects of silver thiosulfate. Aquat. Toxicol., 35, 111-125.
177. Wood, C. M., R. C. Playle et C. Hogstrand. (1999). Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. Environ. Toxicol. Chem., 18, 71-83.
178. Wood, J. M. (1976). Les métaux toxiques dans l'environnement. La Recherche, 7: 711-719.
179. Yamazaki, M., Y. Tanizaki et T. Shimokawa. (1996). Silver and other trace elements in a freshwater fish, *Carasius auratus langsdorfii*, from the Asakawa River in Tokyo, Japan. Environ. Pollut., 94, 83-90.
180. Yildiz, F. H., J. P. Davies et A. R. Grossman. (1994). Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. Plant Physiol., 104, 981-987.